

LAURO MANHÃES DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOESTRUTURAL E MOLECULAR DO PROCESSO DE
AMASTIGOGÊNESE EXTRACELULAR EM *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Samuel Goldenberg

CURITIBA

2007

PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Dr. Samuel Goldenberg

Orientador do Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP


Dr. Renato DaMatta

Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF


Dr. Maurílio José Soares

Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz


Dr. Dorly de Freitas Buchi

Universidade Federal do Paraná - UFPR


Dr. Stenio Perdigão Fragoso

Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

e tendo como suplentes,

Dr. Cláudia Nunes Duarte dos Santos

Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

Dr. Andréa Rodrigues Ávila

Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

após arguir o(a) doutorando(a) **Lauro Manhães de Souza** em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "**Caracterização morfoestrutural e molecular do processo de amastigogênese extracelular sofrido pelo Trypanosoma cruzi**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Doutor está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 23 de agosto de 2007


Ricardo Fernandez Perez
Coordenador do Curso

À minha doce Vivika

Aos meus queridos pais, Helena e Jarbas

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Samuel Goldenberg, pela oportunidade, confiança e orientação.

Aos meus colegas de bancada do Lab. 2, Dr. Stenio, Léo, Marcinha, Gisele, Rosana, Tati, Flávia, Lucia, Édio, Patrícia, Janaina, Daniela, Didi, Alda pelo excelente ambiente de trabalho e amizade que sempre cultivaram.

Aos Nilson, Vanessa e Suzana pelo suporte técnico.

Aos demais companheiros do IBMP, pela imensa ajuda durante os experimentos, análises de resultados e discussões nem sempre científicas.

A Dra. Cristina Mota, pelo constante incentivo, otimismo e ajuda para a realização dos projetos, especialmente a parte de microscopia eletrônica.

Ao Miguel Corrêa-da-Silva, pelo excelente trabalho de microscopia eletrônica.

Aos amigos da UTEP, Dr. Igor, Dra. Rosa, Dra. Luciane, Ernesto, Raphael, Murilo e Lílian, pela maneira como me receberam em seu laboratório e grande auxílio nos experimentos.

Ao CNPq e IBMP pelo suporte financeiro.

Ao bondoso Pai nos Céus, pelo cuidado amoroso e constante.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2 CICLO EVOLUTIVO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	2
1.3 CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	5
1.4 MOLÉCULAS DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO COM CÉLULA HOSPEDEIRA.....	7
1.4.1 Glicoproteínas Ancoradas por GPI (Glicosil-fosfatidil-inositol)	8
1.4.2 Trans-sialidase e gp90	9
1.4.3 Penetrina e Tc80 Prolil oligopeptidase	10
1.4.4 Cruzipaína	11
1.4.5 Tc-Tox	11
1.5 O GENOMA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	12
1.6 TRANSCRIÇÃO E CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS.....	15
1.6.1 Controle da Expressão Gênica – Eventos Nucleares.....	18
1.6.2 Controle da Expressão Gênica – Eventos Citoplasmáticos	19
1.7 LIPÍDIOS NO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	21
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES E MATERIAIS.....	25
3.2 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA	26
3.3 CULTIVO E OBTENÇÃO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	27
3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO Ssp-4	29
3.5 MICROSCOPIA ÓPTICA	30
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	30
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	30
3.8 OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS DO <i>T. CRUZI</i>	31
3.9 ANÁLISE DOS LIPÍDIOS TOTAIS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (ESI- MS).....	31
3.10 MARCAÇÃO COM BIOTINA	32
3.11 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS EM EXTRATOS DE <i>T. CRUZI</i>	32
3.12 OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE EPIMASTIGOTA DO <i>T. CRUZI</i>	33
3.13 OBTENÇÃO DE RNA POLISSOMAL DE <i>T. CRUZI</i>	33
3.14 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS	34
3.15 TRATAMENTO COM DNASE	34
3.16 PURIFICAÇÃO DE RNA ATRAVÉS DE RNeasy (QIAGEN)	35
3.17 AMPLIFICAÇÃO IN VITRO DE RNA.....	35
3.18 CONFEÇÃO DO MICROARRANJO DE DNA	35
3.19 MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS COM FLUORÓFOROS E HIBRIDIZAÇÃO	36

3.20 LEITURA, ANÁLISE E TRATAMENTO DAS IMAGENS E SINAIS OBTIDOS	39
3.20.1 Normalização dos Dados	39
3.20.2 Questão da Replicação Interna.....	40
3.21 IDENTIFICAÇÃO DAS DIFERENÇAS NAS COMPARAÇÕES DE INTERESSE ..	40
3.21.1 Identificação de Genes Diferencialmente Expressos entre Epimastigota e Amastigota Extracelular	41
3.22 AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO.....	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 OBTENÇÃO DOS AMASTIGOTAS	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA	45
4.3 CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA DO <i>T. CRUZI</i>	51
4.4 CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DO <i>T. CRUZI</i>	59
4.5 MICROARRANJO DE DNA	62
5 DISCUSSÃO	81
5.1 A AMASTIGOGÊNESE	81
5.2 LIPÍDIOS E A AMASTIGOGÊNESE	83
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	86
6 CONCLUSÃO	89
7 PERSPECTIVAS.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS	104

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, que continua sendo um importante problema de saúde pública na América Latina. Os estudos sobre o *T. cruzi* têm sido facilitados pela possibilidade de cultivo e diferenciação *in vitro* dos principais estágios evolutivos do parasita. Este trabalho aborda o estudo de aspectos morfológicos e moleculares da diferenciação *in vitro* de tripomastigotas metacíclicos para amastigotas (amastigogênese extracelular). Extensas mudanças morfológicas foram caracterizadas por microscopia óptica e eletrônica durante a diferenciação, como brotamento, crescimento e liberação de uma estrutura muito semelhante à forma amastigota, com capacidade replicativa e positiva para a marcação com o anticorpo α -Ssp-4 específico para amastigotas. Análises por espectrometria de massas mostraram que o perfil lipídico total é alterado, com aumento na proporção de liso-lipídios durante a diferenciação, podendo estar correlacionado às alterações morfológicas observadas no processo de amastigogênese. Com o intuito de obter amostras enriquecidas de membrana plasmática, foi elaborada uma nova estratégia, baseada na interação biotina/avidina. Tal estratégia visou o estudo mais detalhado dos constituintes da membrana, visto que foi observada alteração em sua forma, sugerindo sua relevância para o processo de diferenciação. Foram também feitas análises do transcrito de amastigotas extracelulares utilizando microarranjos de DNA, comparando-os com os demais estágios, principalmente tripomastigotas metacíclicos e amastigotas obtidos de cultura de células. Estas análises proporcionaram uma visão geral dos grupos de genes diferencialmente expressos entre tripomastigotas metacíclicos e amastigotas extracelulares, no qual se pode destacar como aumentados em amastigotas genes envolvidos na replicação, reparo e transcrição do DNA, e no processamento de RNA. Também foram detectados genes com o mesmo padrão de expressão em amastigotas extracelulares e amastigotas de cultura de célula, sugerindo a proximidade entre os dois tipos de formas replicativas intracelulares. Tais grupos gênicos podem ser agora melhor investigados, corroborando para a elucidação dos mecanismos de regulação de sua expressão, suas funções em cada estágio e sua importância durante a diferenciação. Os dados aqui apresentados abrem muitas perspectivas para a investigação da amastigogênese, um fenômeno ainda pouco conhecido, de vital importância para o *T. cruzi* e que pode conter novas informações para o desenvolvimento de terapias para doença de Chagas.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas' disease, which still represents an important public health problem in Latin America. Studies on *T. cruzi* have been rendered feasible by the possibility to reproduce under *in vitro* culture conditions the life-cycle of the parasite. This work is focused on the description of the morphological and molecular changes occurring in the course of the *in vitro* differentiation of metacyclic trypomastigotes to amastigotes (extracellular amastigogenesis). The morphological changes have been characterized by optical and electron microscopy investigation during differentiation, including budding, development and release of a structure resembling to amastigote forms. These extracellular amastigotes are able to replicate and react with an antibody against the Ssp-4 antigen, which is specific for amastigotes. Mass-spectrometry analyses have shown total lipid profile changes during amastigogenesis, with an increase in lyso-lipids ratios during differentiation; this could be related to morphological alterations observed in the course of the amastigogenesis process. In order to obtain plasma membrane enriched samples, a new strategy was elaborated based on biotin/avidin affinity purification. The strategy aims to identify plasma membrane and its components, since important morphological changes occur during amastigogenesis which are very likely relevant to differentiation process. Furthermore, the transcriptome analysis of extracellular amastigotes is described using DNA microarrays to compare metacyclic trypomastigotes and cell culture derived amastigotes. These analyses allowed a broad comparison between metacyclic trypomastigotes and extracellular amastigotes differentially expressed group of genes, such as those involved in replication, repairing and transcription of DNA, and processing of RNA, almost all of them more expressed in extracellular amastigotes. Genes presenting similar expression patterns have been also observed in extracellular and intracellular amastigotes, suggesting the similarity between these developmental forms. These genes are being investigated in order to get further insight into the mechanisms involved in their expression regulation and their relevance to the differentiation process. The data presented herewith pave the way to investigate the amastigogenesis process, an important step of *T. cruzi* life-cycle.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

O *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, enfermidade que acomete entre 16 e 18 milhões de pessoas no continente americano, sendo responsável por 21 mil mortes a cada ano, representando ainda um grave problema de saúde pública. Além disso, estima-se que 120 milhões de pessoas estejam vivendo em área de risco (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>).

Essa enfermidade foi descrita pela primeira vez em 1909 por Carlos Chagas (Chagas, 1909), que foi enviado à frente de construção da ala mineira da estrada de ferro Central do Brasil, em Lassance – MG, para estudar uma doença que acometia os trabalhadores, incapacitando-os. De maneira notável, ele descreveu o parasita causador da doença, os vetores (insetos hematófagos comumente conhecidos como “barbeiro”), o ciclo de vida do parasita e vários aspectos epidemiológicos, clínicos e sociais.

A doença de Chagas tornou-se um dos principais problemas de saúde pública em certas regiões do Brasil e América Latina, despertando nas autoridades sanitárias a necessidade de combater a transmissão com simples medidas de saneamento básico, como a substituição das casas de pau-a-pique, visando tornar as habitações menos atrativas para o “barbeiro”. A doença também começou a ser estudada em centros de pesquisas e universidades em todo o mundo, cujo pioneiro foi o Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Apesar dos estudos já durarem praticamente um século, com importantes avanços no conhecimento de vários aspectos da doença, ainda não se chegou a uma vacina que previna ou a um tratamento eficaz para a fase crônica da doença. As drogas nifurtimox e benzonidazol efetivamente matam o parasita presente no ser humano, mas só são eficazes na fase aguda (que muitas vezes passa sem ser percebida) e geram fortes efeitos colaterais. Os métodos de diagnósticos ainda não chegaram ao nível de precisão, custo e acessibilidade desejáveis.

Em 2005, um grupo de trabalho formado por diversos especialistas de vários países reuniu-se em Buenos Aires para discutir e priorizar ações relacionadas às seguintes áreas da doença: o ônus da doença e seus determinantes sociais; epidemiologia; controle de vetores; transmissão por transfusão de sangue; parasitologia e patogênese; diagnóstico e avaliação da infecção; descoberta e desenvolvimento de novos tratamentos; gerenciamento e acesso de tratamento para os casos de fase aguda, indeterminada e crônica da doença; e gerenciamento da doença de Chagas em países não-endêmicos (http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/swg_chagas.pdf). É fácil notar que apesar de todos os avanços obtidos principalmente nos últimos vinte anos, a doença de Chagas se revela cada vez mais desafiadora e intrigante, exigindo como nunca frentes multidisciplinares para ser entendida em um nível que possa ser tratada satisfatória e eficazmente.

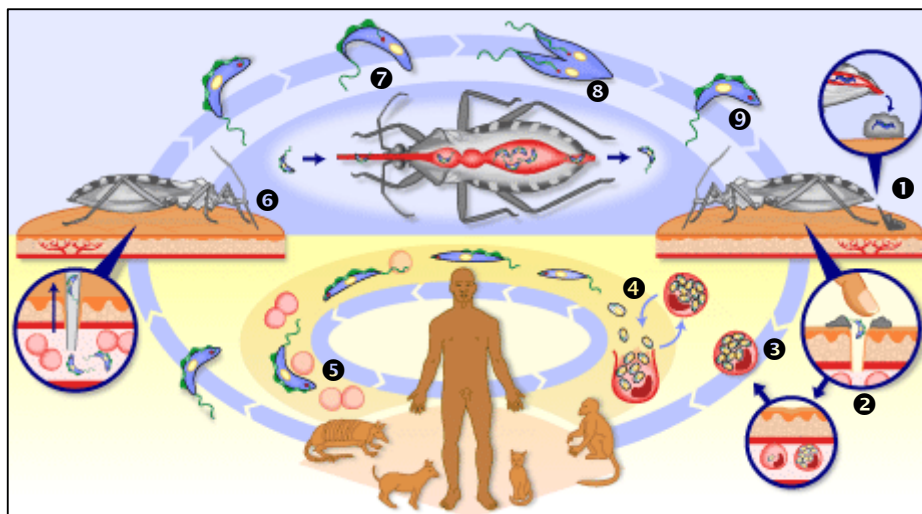
1.2 CICLO EVOLUTIVO DO *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros mamíferos e insetos da ordem Hemiptera, família *Reduviidae*. Como os ambientes apresentados ao *T. cruzi* são muito diferentes em suas características físico-químicas, este desenvolveu ao longo da evolução estratégias que o habilitaram a lidar com essas diferenças. Muitas características do parasita como morfologia, ciclos metabólicos, expressão diferenciada de moléculas internas e de superfície, capacidade de infecção, de multiplicação, entre outras, devem ser adequadas a cada novo ambiente. Com base nestas mudanças, o *T. cruzi* possui em seu ciclo de vida três estágios evolutivos bem caracterizados: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Há ainda as formas variantes, mais facilmente observadas durante a transição entre estágios e ainda pouco estudadas como a esferomastigota, tripomastigota *slender* e *broad* (revisto por De Souza, 2002) e *epimastigote-like* (Faucher *et al.*, 1995; Almeida-de-Faria *et al.*, 1999), para citar algumas.

Como já dito, tais estágios diferenciam-se entre si segundo diversos conceitos, e o mais facilmente percebido ao microscópio é o morfoestrutural. Com

base na forma e na localização do cinetoplasto em relação ao núcleo, pode-se designar o parasita observado a um dos três estágios mencionados: epimastigotas, medindo entre 20 e 40 μm , possui a maior parte do flagelo desprendida do corpo celular e o cinetoplasto posicionado anteriormente em relação ao núcleo; tripomastigotas, medindo aproximadamente 25 μm de comprimento e 2 μm de diâmetro, possuem o cinetoplasto posterior ao núcleo e a maior parte do flagelo concorrendo ao corpo celular; amastigotas, apresentando forma arredondada e com flagelo muito curto, quase imperceptível, medem cerca de 5 μm de diâmetro (De Souza, 2002; Tyler e Engman, 2001).

A figura 1 ilustra o ciclo de vida do *T. cruzi*. A contaminação de um mamífero, que pode ser um humano, é dada quando um inseto hematófago infectado da subfamília *Triatomine* pica o hospedeiro mamífero para se alimentar. Neste processo, o inseto pode defecar e urinar, depositando sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, infectiva e não replicativa (❶). Pelo reflexo de coçar dos mamíferos, os tripomastigotas metacíclicos acessam mais facilmente a circulação sanguínea, se aderem e invadem outras células do hospedeiro (❷). Inicialmente, o parasita é mantido em um compartimento denominado vacúolo parasitóforo, mas em seguida, escapa deste para o citoplasma, onde se diferencia na forma amastigota e se multiplica por fissão binária, podendo tomar todo o citoplasma (❸). Em geral, os amastigotas se diferenciam na forma tripomastigota antes da célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitas (❹). Assim, há o surgimento de uma forma intermediária designadas por alguns autores como *epimastigote-like*, por se assemelhar morfolologicamente, e por outros critérios, à forma epimastigota, porém, de menor tamanho (Faucher *et al.*, 1995; Almeida-de-Faria *et al.*, 1999).

FIGURA 1 – ESQUEMA DO CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

FONTE: TDR/Welcome Trust (com modificações)

Esses tripomastigotas infectam novas células dando origem a um ciclo particular no hospedeiro mamífero (5). Eles também podem ser sugados pelo inseto vetor durante o repasto sangüíneo (6), indo parar na porção anterior de seu intestino. Neste novo ambiente, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (7) podendo passar pelos estágios amastigota e esferomastigota (Tyler e Engman, 2001). Quando alcançam a porção posterior, começam a multiplicar-se por divisão binária (8), podendo aderir-se às células intestinais via hemidesmossomos (Zeledon, 1997, *apud* De Souza, 2002). Ao chegarem à ampola retal, os epimastigotas aderem-se por hidrofobicidade à cutícula cerosa que recobre a parede desta região. Este evento tem sido considerado importante no disparo da metaciclogênese (Bonaldo *et al.*, 1988; Kleffmann *et al.*, 1998), assim como o estado nutricional do inseto vetor, a cepa de *T. cruzi* em questão, o pH e a osmolalidade do meio, a presença de soro de mamífero e de componentes da hemolinfa, e o AMP cíclico (Gonzalez-Perdomo *et al.*, 1988). Uma vez completada a diferenciação (9), os tripomastigotas metacíclicos se soltam da cutícula, podendo ser eliminados na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sangüíneo.

Outras formas de transmissão da doença podem ocorrer em transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidentes de laboratório e por via oral. Esta última ganhou recentemente grande notoriedade na imprensa devido à contaminação de

algumas pessoas pela ingestão de garapa no estado de Santa Catarina e de suco de açaí no norte do Brasil.

1.3 CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DO *Trypanosoma cruzi*

Os esforços para desenvolver um sistema de cultivo para o *T. cruzi* remontam a época do início do desenvolvimento de meios de cultura para os demais tipos celulares. Na tentativa de se cultivar epimastigotas foram empregados meios de cultura bifásicos cujos componentes envolviam suco de tomate, extrato de hemoglobina humana e plasma humano (Citri e Grossowicz, 1955, *apud* Shuster e Sullivan, 2002). Outro meio bifásico, desenvolvido por Novy e McNeal (1904, *apud* Shuster e Sullivan, 2002) para o cultivo de *Trypanosoma brucei* e em seguida modificado por Nicolle (1908, *apud* Shuster e Sullivan, 2002), foi o NNN. Consiste basicamente de agar sangue e é usado até hoje em outros tripanosomatídeos, incluindo *Leishmania spp* e *T. cruzi*. Outros protocolos incluíam infusão de cérebro e coração com sangue de ovelha (Zeledon, 1959, *apud* Shuster e Sullivan, 2002). Camargo (1964) desenvolveu um meio líquido denominado LIT (*Liver Infusion Tryptose*) em razão de seus principais constituintes, infusão de fígado e triptose. Este meio continua sendo amplamente utilizado, além de ter servido de base para o desenvolvimento de outros meios de cultura. Posteriormente, muitos dos componentes dos meios complexos foram sendo substituídos por outras formulações até se chegar a meios de cultura definidos como o AR-103 (de Azevedo e Roitman, 1977, *apud* Shuster e Sullivan, 2002). Outro meio definido foi desenvolvido por Ávila e colaboradores (1979) e em seguida o mesmo grupo desenvolveu um meio mínimo em que nem *Trypanosoma rangeli*, nem *Leishmania spp* cresciam, apenas o *T. cruzi* (Ávila *et al.*, 1983).

Com o propósito de se estudar a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, foi desenvolvido, de forma pioneira, um sistema de diferenciação celular usando meio quimicamente definido capaz de estimular a metaciclogênese pela simulação das condições físico-químicas encontradas na porção final do intestino do inseto triatomíneo (Contreras *et al.*, 1985). Epimastigotas cultivados até a fase estacionária eram submetidos a um estresse

nutricional e em seguida incubados no meio TAU3AAG (*Triaromine Artificial Urine* enriquecido com prolina, glutamina, aspartato, e glicose) a 28 °C. Esse sistema obteve grande sucesso para algumas cepas e é extensamente usado em estudos com o clone Dm28c, tanto para obter formas metacíclicas quanto para se estudar o fenômeno de metaciclogênese, usando diferentes abordagens. Outro protocolo para obtenção de tripomastigotas foi desenvolvido por Isola e colaboradores (1986) e tinha como base principal o meio Grace e extratos de intestino de triatomíneo, que contém fatores de disparo da metaciclogênese. Apesar de poder ser aplicado com sucesso em maior número de cepas de *T. cruzi*, é extremamente trabalhoso e a taxa de metaciclogênese é inferior às obtidas com o meio TAU3AAG.

O estágio amastigota sempre foi obtido a partir da infecção de célula hospedeira. No início, utilizava-se o tecido hospedeiro completo, como músculo cardíaco de embrião de roedores (Kofoid *et al.*, 1935, *apud* Shuster e Sullivan, 2002). Posteriormente, foram testadas culturas de diferentes tecidos e espécies a diferentes temperaturas, para se conhecer o sistema mais eficiente. Culturas de músculo de pele de embrião humano a 33 °C resultaram em maior percentagem de células infectadas (Neva *et al.*, 1961, *apud* Shuster e Sullivan, 2002). Hoje, vários grupos obtêm formas amastigotas a partir da infecção de culturas de células Vero. Um outro grupo desenvolveu um sistema livre de células cujo meio de cultura promovia a multiplicação de amastigotas, mas estes eram previamente obtidos em células Vero, purificados e transferidos para o meio L-15 de Leibovitz modificado (Villalta e Kierszenbaum, 1982).

Contreras e colaboradores (2002) desenvolveram um sistema capaz de induzir a diferenciação em amastigotas a partir de tripomastigotas metacíclicos, sem a necessidade de invasão de uma célula hospedeira. Isso foi conseguido com o meio MEMTAU, uma combinação entre o meio MEM (*Minimum Essential Medium*) e o meio TAU3AAG, enriquecido com soro fetal bovino e cultivado a 37 °C. Mais uma vez, bons resultados foram obtidos com esse sistema de diferenciação que permite a obtenção de grandes quantidades de formas amastigotas, sem o inconveniente “contaminante” de restos de célula hospedeira, fundamental em alguns tipos de experimentos. Além disso, esse sistema possibilita o estudo mais detalhado, e sob diversas abordagens, da diferenciação para amastigota, estágio multiplicativo do parasita no hospedeiro vertebrado, entre eles o homem.

Alguns destes sistemas de cultivo e diferenciação podem ser considerados a espinha dorsal deste trabalho. Através deles é que pudemos obter as células e viabilizar os estudos aqui apresentados. Todo o processo de amastigogênese foi caracterizado por microscopia óptica, eletrônica de varredura e de transmissão. Com base nessas observações é que surgiu o interesse de se investigar, por espectrometria de massas, os perfis lipídicos durante a amastigogênese e nos demais estágios do *T. cruzi*. Todos os estágios participaram na construção de uma visão inicial, geral e comparativa da expressão gênica, por meio dos experimentos de microarranjo de DNA. Reconhecemos o grande potencial destes sistemas de diferenciação e cultivo, e sabemos que eles continuarão a ser o ponto de partida para muitos estudos no *T. cruzi*.

1.4 MOLÉCULAS DO *Trypanosoma cruzi* ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO COM CÉLULA HOSPEDEIRA

A fim de infectar a célula hospedeira e se multiplicar, moléculas na superfície do *T. cruzi* precisam reconhecer e se ligar a moléculas na matriz extracelular e/ou na superfície da célula hospedeira. Esses eventos costumam ser definidos simplesmente como adesão e são cruciais para que o mecanismo de invasão seja acionado. Como o estágio tripomastigota (com suas diferentes variantes, a saber: metacíclico de barbeiro; metacíclico derivado cultura de epimastigota; sangüíneo; e derivado infecção de cultura de células) é considerado a principal forma infectiva, e diferentes tipos de células do hospedeiro são passíveis de sofrer a invasão, é razoável pensar que haja mecanismos moleculares distintos envolvidos em cada tipo de interação. Tanto com o estabelecimento de metodologias de obtenção e cultivo do *T. cruzi* e seus diferentes estágios evolutivos, quanto de grandes quantidades de linhagens de células de mamíferos, vários aspectos desta interação foram caracterizados e muitos outros continuam indefinidos. Outro ponto relevante na interação é a cepa de *T. cruzi* envolvida, que pode ser muito ou pouco infectiva. Essa característica estabelece uma relação direta com os tipos de moléculas presentes em sua superfície. A descrição a seguir contempla apenas algumas

moléculas e vias envolvidas que consideramos importantes, pois têm sido alvos de extensa investigação.

1.4.1 Glicoproteínas Ancoradas por GPI (Glicosil-fosfatidil-inositol)

Grande parte dos mecanismos de reconhecimento e invasão da célula hospedeira está relacionada com o disparo de vias de sinalização que levam ao aumento transiente na concentração citoplasmática de cálcio, tanto no *T. cruzi* quanto na célula hospedeira. Tripomastigotas metacíclicos de cepas bem infectivas como a CL expressam em sua superfície uma glicoproteína de 82 kDa ancorada por GPI, conhecida como gp82 (Ramirez *et al.*, 1993). Essa proteína quando interage com seu receptor na célula hospedeira dispara o aumento transiente de cálcio em ambas as células (embora com cinéticas diferentes), levando aos eventos de invasão (Ruiz *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2000). Tais eventos são prejudicados quando a gp82 é bloqueada por anticorpos monoclonais (Ramirez *et al.*, 1993). A via de sinalização que leva ao aumento de cálcio no parasita parece contar com a ativação de proteínas tirosino-cinases, que fosforilam a proteína p175 (presente em formas infectivas), e com a ativação da via da fosfolipase C, gerando inositol 3-fosfato que se liga aos canais de cálcio no retículo endoplasmático, liberando cálcio para o citoplasma. A maneira como essas vias estão relacionadas ainda é desconhecida, mas sabe-se que o uso de inibidores e competidores afeta o aumento nos níveis de cálcio no parasita e, conseqüentemente, a invasão (Yoshida *et al.*, 2000).

Outro mecanismo de disparo da sinalização por cálcio é visto em cepas pouco infectivas, como a cepa G. Elas baseiam o processo de invasão em mais uma glicoproteína de superfície ancorada por GPI, a gp35/50, que também possui receptor na superfície da célula hospedeira (Ruiz *et al.*, 1998). AMP cíclico parece estar envolvido nesta via, pois na presença de forskolina, um ativador da enzima adenilato ciclase, a infectividade é aumentada. Já quando o parasita é previamente tratado com substâncias que liberam cálcio a partir dos acidocalcisomos, a infectividade cai significativamente, sugerindo que o íon em questão possa vir desta organela (Neira *et al.*, 2002). Tanto na invasão mediada por gp82 quanto por gp35/50 ainda não está claro como tais proteínas ancoradas por GPI na face externa

da membrana plasmática podem transmitir sinais para o interior do *T. cruzi*. A gp35/50 também é aceptora de moléculas de ácido siálico presentes no meio ou na superfície da célula hospedeira, pela ação de uma família de enzimas de destaque no *T. cruzi*, as trans-sialidases.

1.4.2 Trans-sialidase e gp90

As trans-sialidases tanto podem ser secretadas como expressas na superfície de tripomastigotas (Souto-Padrón *et al.*, 1990) e são responsáveis por reconhecer, remover e transferir ácido siálico (Schenkman e Eichinger, 1993) de glicoconjugados exógenos para glicoproteínas do tipo mucinas na superfície do *T. cruzi*. As trans-sialidases podem conferir proteção contra a ação da via alternativa do complemento no hospedeiro mamífero, apesar de suas funções não serem ainda bem compreendidas. Entretanto, se por um lado há benefícios, por outro há limitações. Em metacíclicos da cepa G foi mostrado que a remoção do ácido siálico pelo tratamento com neuraminidase aumentava a adesão, a resposta ao disparo na via de sinalização por cálcio e a infectividade do parasita (Yoshida *et al.*, 1997). Talvez esse possa ser um dos fatores de baixas taxas de infectividade por metacíclicos que tem na gp35/50 uma das primeiras ferramentas no disparo do mecanismo de invasão. Em tripomastigotas obtidos de cultura de células, a invasão aumentava quando a atividade da trans-sialidase era bloqueada por anticorpos (Cavallesco e Pereira, 1988).

Por outro lado, resultados contraditórios foram obtidos posteriormente, quando subpopulações de *T. cruzi* que não expressavam trans-sialidases se mostraram menos invasivas que as que expressavam, e que tal quadro era mudado com a adição de trans-sialidase de *T. cruzi* no meio (Pereira *et al.*, 1996). Já a participação do ácido siálico da célula hospedeira no processo de invasão foi considerada em diferentes trabalhos em que células Lec-2 (células CHO deficientes em ácido siálico) se mostraram menos invadidas que as CHO parentais. Ao serem submetidas à trans-sialidase os índices de adesão e invasão eram normalizados (Schenkman *et al.*, 1993; Ming *et al.*, 1993).

Seguindo por essa linha, outra glicoproteína ancorada por GPI (Shenckman *et al.*, 1988) e expressa apenas em formas metacíclicas (Yoshida *et al.*, 1990), a

gp90, parece regular negativamente a invasão. A célula hospedeira possui receptores específicos para a gp90 que quando são ocupados levam a ativação de uma proteína tirosino-fosfatase no parasita. Essa proteína desfosforila a p175, se contrapondo ao aumento transiente do cálcio citoplasmático e da invasão (Manque *et al.*, 2003). Novamente, não se conhece como o sinal é transmitido para o interior do parasita, mas acredita-se que o tipo de lipídio presente na âncora de GPI possa estar relacionado, já que em epimastigotas trata-se principalmente de glicerofosfolipídio e em metacíclicos, de ceramida (Acosta-Serrano *et al.*, 1995).

1.4.3 Penetrina e Tc80 Prolil oligopeptidase

A infecção de células de mamíferos em cultura tornou mais prática a obtenção de formas tripomastigotas, que refletiu em aumento no número de estudos realizados com essa fase do ciclo evolutivo, principalmente no que diz respeito à interação com a célula hospedeira. Tal condição é a que mais se aproxima *in vitro* da relação entre parasita e hospedeiro durante a fase crônica da doença. Nesta fase o *T. cruzi* está alojado em órgãos e para continuar seu ciclo, precisa interagir primeiramente com a matriz extracelular e depois com a célula propriamente dita. Para tal, os tripomastigotas expressam uma série de moléculas de superfície capaz de interagir e até hidrolisar componentes da matriz extracelular. Dentre elas, há uma proteína de superfície de 60 kDa chamada penetrina, que através da afinidade por moléculas como heparina, heparan sulfato e colágeno, promovem adesão e penetração dos tripomastigotas em fibroblastos (Ortega-Barria e Pereira, 1991).

Outra proteína que interage com a matriz, hidrolizando fibronectina, é a POP (prolil oligopeptidase) Tc80, que parece ter influência na invasão, uma vez que o uso de inibidores bloqueia a entrada de tripomastigotas em células não fagocíticas de mamíferos. O envolvimento de componentes da matriz extracelular pôde ser visto com o uso de mutantes deficientes na produção de proteoglicanas, que se mostraram pouco infectados pelos tripomastigotas (Herrera *et al.*, 1994).

1.4.4 Cruzipaína

A principal cisteína proteinase do *T. cruzi*, chamada cruzipaína, é encontrada em todos os estágios evolutivos (Murta *et al.*, 1990) e sua participação na invasão e desenvolvimento do parasita na célula hospedeira foi mostrado através do uso de inibidores (Meirelles *et al.*, 1992). Quando a cruzipaína atua sobre o cininogênio (um substrato natural) gera a bradicinina, uma molécula reconhecida por receptores nas células hospedeiras. Ao serem ativados, os receptores promovem o disparo da via de aumento transiente de cálcio intracelular, culminando nos eventos de invasão. Contudo, o funcionamento desta via se mostrou dependente do tipo de célula hospedeira e de cepa de *T. cruzi* usada (Scharfestein *et al.*, 2000). Um evento capaz de potencializar o efeito da cruzipaína foi atribuído à interação com moléculas presentes na matriz extracelular e na superfície da célula hospedeira, como o heparan sulfato. Experimentos com essa molécula mostraram que a cruzipaína pode sofrer aumento de até seis vezes em sua atividade e gerar uma quantidade 35 vezes maior de bradicinina (Lima *et al.*, 2002), corroborando a idéia do envolvimento de componentes do hospedeiro na atividade desta enzima.

1.4.5 Tc-Tox

Foi verificado que o *T. cruzi* libera no meio de cultura um fator capaz de lisar eritrócitos de diferentes espécies, que é sensível a tripsina, a inibidores metabólicos e com atividade máxima em pH 5,5 (Andrews e Whitlow, 1989). Isso levantou a hipótese de que tal fator fosse ativo no interior do vacúolo parasitóforo, auxiliando na destruição da membrana deste e no conseqüente escape do parasita para o citoplasma. Ley e colaboradores (1990) mostraram, por microscopia eletrônica, que vacúolos parasitóforos recentemente formados, contendo tanto tripomastigotas como amastigotas, apresentavam pH ácido. Após duas horas de infecção, 70% dos parasitas encontravam-se em vacúolos parcialmente destruídos ou livres no citoplasma. Entretanto, quando o pH do vacúolo era elevado através da incubação com cloroquina, cloreto de amônio, metilamina ou monensina, o escape dos parasitas era drasticamente inibido (Ley *et al.*, 1990). Posteriormente, observou-se

que tal fator liberado pelo *T. cruzi* era uma proteína que reagia com anticorpos contra o componente C9 do sistema complemento de humanos, passando a ser chamada de Tc-Tox. O mecanismo de ação desta proteína se assemelha ao de canais de íons transmembrana em bicamadas de fosfolipídios. A localização da Tc-Tox no lúmen do vacúolo parasitóforo foi feita através de anticorpos monoclonais, sugerindo que depois de secretada pelo *T. cruzi*, tal proteína se incorpore à membrana do fagossomo, formando poros que contribuem para sua desestruturação e posterior escape do parasita para o citoplasma (Andrews *et al.*, 1990). A Tc-Tox tem sua atividade otimizada pela ação da trans-sialidase. Esta age removendo os resíduos de ácido siálico das principais glicoproteínas encontradas em lisossomos de mamíferos, as Lgp_s (glicoproteínas de lisossomos), o que torna a membrana dos lisossomos mais exposta à Tc-Tox (Andrews, 1994).

1.5 O GENOMA DO *Trypanosoma cruzi*

A diversidade genética do *T. cruzi* tem sido observada já há algum tempo através de diferentes abordagens, como busca por marcadores enzimáticos, polimorfismos no tamanho de fragmentos de restrição do kDNA, cariótipos moleculares, *fingerprints* de DNA, entre outros (Miles, 1983; Morel *et al.*, 1980; Henrikson *et al.*, 1993; Macedo *et al.*, 1992). Com base nestas análises, o *T. cruzi* pode ser classificado em dois grupos: os integrantes do grupo 1 estão envolvidos no ciclo de transmissão selvagem e na infecção de marsupiais; os do grupo 2 estão associados ao ciclo doméstico, transmissão e à infecção dos outros mamíferos (Fernandes *et al.* 1998, Zingales *et al.* 1998). Essa diversidade também se aplica à quantidade total de material genético, que pode variar em mais de 100% entre cepas e até mesmo entre clones derivados da mesma cepa (Kooy *et al.* 1989, Thompson e Dvorak 1989, McDaniel e Dvorak 1993).

O genoma do *T. cruzi* é marcado por conter várias seqüências de DNA repetidas em *tandem*. Tais seqüências são compostas por genes codificadores de proteínas, como as que formam o glicocálice do parasita, e cuja localização pode ser dispersa pelo genoma e em áreas mais específicas como as regiões subteloméricas. Outros membros deste grupo são os genes que codificam os diferentes tipos de

RNA e as proteínas constitutivas (*housekeeping*) como histonas, tubulina, actina, entre outras. Sequências repetitivas também são características para os elementos de transposição (como os retrotransposons), micro e minisatélites, e sequências intercalantes. No genoma, há ainda aqueles genes codificadores de proteínas de cópia única, além de sequências que atuam como espaçadores ou conectores. Elas podem estar situadas tanto entre os genes codificadores de proteínas quanto entre os genes codificadores de RNA.

Além do DNA nuclear, o *T. cruzi* possui o DNA de sua única mitocôndria, ou kDNA, que forma uma estrutura celular característica da ordem Kinetoplastida, o cinetoplasto. Tal estrutura é composta por algumas dúzias de maxicírculos de aproximadamente 23 kpb e por milhares de minicírculos contendo por volta de 1,4 kpb, todos concatenados formando uma rede complexa. O kDNA representa entre 10 e 15% do DNA total da célula (Lukes *et al.*, 2002; Junqueira *et al.*, 2005). Os maxicírculos contêm os genes responsáveis por manter as funções da mitocôndria (Westemberger *et al.*, 2006). Muitos deles sofrem regulação pós-transcricional num processo conhecido como edição de RNA, no qual a molécula de mRNA sofre adição ou deleção de uma ou mais moléculas de uridina (Simpson *et al.*, 2004). Os minicírculos se encarregam de codificar os RNA guia, pequenos transcritos que determinam o local e o número de inserções ou deleções no processo de edição de RNA. Outra característica dos minicírculos é sua capacidade de se integrar ao genoma do hospedeiro e agir como um fator mutagênico (Teixeira *et al.*, 1991; Simões-Barbosa *et al.*, 1999), podendo estar relacionado à patologia na doença de Chagas (Nitz *et al.*, 2004).

Os cromossomos do *T. cruzi* têm a característica de não se condensar durante a divisão celular, o que inviabilizou seu estudo por métodos convencionais de citogenética, amplamente aplicados a eucariotos superiores. Com o desenvolvimento da eletroforese de campo pulsado, essa barreira foi superada, permitindo a separação de cromossomos inteiros. Somado a isso, a associação de técnicas de hibridização usando diferentes sondas de DNA permitiu a obtenção de cariótipos moleculares e a observação de que o tamanho, o número de bandas dos cromossomos e a localização dos genes nestes, variam grandemente entre cepas e clones de *T. cruzi*, evidenciando a alta plasticidade deste genoma (Gibson e Miles, 1986; Aymerich e Goldenberg, 1989; Wagner e So, 1990; Cano *et al.*, 1995). Essa

plasticidade se evidencia no caráter híbrido e aneuplóide do *T. cruzi*, que pode conferir mecanismos de sobrevivência ao estresse ambiental, promover heterogeneidade intra-específica e gerar a diversidade observada na doença de Chagas (McDaniel e Dvorak, 1993). Apesar de tantas mudanças, o cariótipo do clone Dm28c se mostrou praticamente inalterado nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, indicando que não há rearranjos aparentes nos cromossomos deste clone nesta parte do ciclo de vida do parasita. Além disso, este trabalho demonstrou pela primeira vez a ausência de mini-cromossomos em *T. cruzi* (Aymerich e Goldenberg, 1989). Tais estruturas são abundantes em *T. brucei*, havendo aproximadamente 100 mini-cromossomos com tamanho entre 50 e 150 kb (Williams *et al.*, 1982; Van der Ploeg *et al.*, 1984a). Nelas, há repetições de vários tipos de seqüências encontradas nos cromossomos maiores, inclusive seqüências de regiões teloméricas (De Lange *et al.*, 1983) e subteloméricas (Blackburn e Challoner, 1984; Van der Ploeg *et al.*, 1984b). O único gene conhecido presente nos mini-cromossomos são os da VSG, apesar de não serem transcritos a partir desta estrutura (Borst, 1986). Sugere-se que os mini-cromossomos estejam envolvidos no aumento do repertório dos genes da VSG (Van der Ploeg *et al.*, 1984a), uma vez que não estão presentes em flagelados da ordem Kinetoplastida que não lançam mão do processo de variação antigênica semelhante ao do *T. brucei* (Van der Ploeg *et al.*, 1984c).

Análises de densitometria baseados em cariótipos moleculares feitos com o DNA da cepa CL Brener estimaram que o tamanho do genoma nuclear diplóide é de aproximadamente 87 mpb, com 64 cromossomos de tamanhos entre 0,45 e 4,0 mpb, cabendo frisar que os métodos empregados nestas medições tinham limitações na precisão reconhecidas pelos próprios autores (Cano *et al.*, 1995). Tal dado contrasta com resultados anteriores obtidos através de análise por microfluorimetria direta, que sugerem um tamanho entre 94 e 150 mpb (Kooy *et al.*, 1989). Num outro estudo, em que foram testadas diferentes condições de separação e hibridização com marcadores cromossomais, o número de cromossomos foi estimado em torno de 40, cujos tamanhos também ficavam entre 0,45 e 4,0 mpb (Henricksson *et al.*, 1995,1996).

Com a publicação da seqüência do genoma do *T. cruzi* (baseada na cepa CL Brener), seu tamanho foi revisto para aproximadamente 110 mpb no genoma

diplóide (El Sayed *et al.*, 2005) e o caráter híbrido de sua origem, reforçado. A análise dos genes anotados indicou a presença de dois haplótipos ao se comparar os *contigs* com dados do genoma da cepa Esmeraldo (El Sayed *et al.*, 2005). Conforme já visto, as cepas de *T. cruzi* são divididas em grupo I e II, de acordo com os hospedeiros que infectam. Estes grupos, por sua vez, estão divididos em subgrupos, em que um ou mais membros podem ter dado origem a outras cepas em outros subgrupos, formando cepas híbridas. Assim, a cepa Esmeraldo é membro do subgrupo *T. cruzi* IIb, um dos progenitores do subgrupo IIc, ao qual pertence a cepa CL Brener (Zingales *et al.*, 1997). A origem deste subgrupo é reconhecida por vários autores (Machado e Ayala, 2001; Gaunt *et al.*, 2003; Brisse *et al.*, 2003) como sendo um híbrido entre os subgrupos IIb e IIc. O subgrupo IIc por sua vez é aparentemente um híbrido derivado do grupo *T. cruzi* I (Westenberger *et al.*, 2005). Tais observações sugerem a participação de vários progenitores durante a evolução das cepas híbridas de *T. cruzi*.

Outra característica marcante no genoma do *T. cruzi* são as seqüências repetitivas de DNA. Elas representam pelo menos 50% de todo o genoma e são formadas principalmente pelas famílias de genes que compõem as proteínas de superfície, como as proteínas de superfície associadas à mucina (MASP), as mucinas, os integrantes da superfamília das trans-sialidases e as glicoproteínas de superfície gp63. No total, esses genes totalizam 18% dos genes codificadores de proteínas no *T. cruzi*. Estão também incluídas neste grupo de seqüências repetitivas as repetições subteloméricas e os elementos de transposição. Estes, respondem por 5% dos doze mil genes estimados no genoma haplóide do *T. cruzi*. Conforme visto em outros tripanosomatídeos, grande parte destes genes encontra-se disposta em extensas unidades repetitivas formadas por até centenas de cópias, resultando num padrão onde a fita codante se alterna em grandes blocos (El Sayed *et al.*, 2005).

1.6 TRANSCRIÇÃO E CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Para os tripanosomatídeos realizarem o processo de transcrição, contam com os três tipos clássicos de RNA polimerase (RNAPol) encontrados em outros

eucariotos e classificadas segundo a resistência à α -amanitina: RNAPol I, II e III. A transcrição apresenta uma dinâmica particular, especialmente aquela realizada pela RNAPol II, para a qual foram descritos poucos promotores nos genes por ela transcritos. Outra particularidade é que os transcritos primários são policistrônicos e sofrem em seguida etapas de processamento para originar o RNA maduro. Dentre estas etapas está a adição de uma sequência de 39 nucleotídeos na região 5' de uma unidade de RNA monocistrônica, denominada sequência líder, por meio de um evento conhecido como trans-splicing (Parsons *et al.*, 1984; Sutton e Boothroyd, 1986; Walder *et al.*, 1986). Outra etapa crucial é a adição de uma cauda poli-A na região 3' do transcrito primário, gerando uma molécula de RNA madura, pronta para ser traduzida. Mais detalhes sobre estes processos são descritos abaixo.

A RNAPol I transcreve os genes de rRNA no nucléolo. Em *T. brucei* ela transcreve ainda os genes dos principais antígenos de superfície, as glicoproteínas VSG, prociclina e os genes a elas relacionados (Gunzl *et al.*, 2003; Pays, 2005).

A RNAPol II é responsável por transcrever os mRNAs em geral, os genes da sequência líder e os genes de pequenos RNAs presentes no nucléolo e até o momento não foram descritos promotores para tais genes. Os genes que codificam proteínas são organizados em unidades policistrônicas com uma região não transcrita na extremidade 5' variando de 1 a 13 kb. Na outra extremidade desta região encontra-se mais um conjunto de genes cuja transcrição tem sentido oposto (ocorre na outra fita). Nesta sequência intergênica, apenas indícios de região promotora são observados (McAndrew *et al.*, 1998) e a transcrição bidirecional parece ser iniciada aleatoriamente ou numa forma não dependente de promotor, em qualquer ponto. Os sinais para o término da transcrição ainda não são evidentes, mas acredita-se que, em *T. brucei*, um desses elementos possa estar entre o gene da proteína repetitiva associada a microtúbulo (MARF) e os genes da prociclina (König *et al.*, 1989). Outra possibilidade são os genes de tRNA, que possuem elementos de terminação para a RNAPol II, e podem estar presentes entre as unidades de transcrição dos genes constitutivos (Marchetti *et al.*, 1998).

Os genes que codificam a sequência SL (*spliced-leader*) são transcritos pela RNAPol II (Campbell *et al.*, 2000) e representam cerca de 6% de toda a síntese de RNA na célula. Os promotores estão presentes à região 5' do gene e são formados, em geral, por 3 elementos situados às posições -60, -30 e -5. Em *Leptomonas*

seymouri foi encontrado um dos fatores de transcrição melhor caracterizado em tripanosomatídeos, que se liga ao elemento -60 (Das e Bellofatto, 2003) denominado PBP-1. Um segundo complexo, o PBP-2 se liga ao elemento -30 (Luo e Bellofatto, 1997) e há indícios de interação protéica com o elemento -5. A região 3' do gene possui uma repetição de 5-31 timinas que pode servir como elemento de terminação. Foi observada a necessidade de pelo menos 6 timinas para que a terminação ocorresse em *Leishmania tarentolae* (Sturm *et al.*, 1999).

A RNAPol II também transcreve os genes snoRNA. Esses genes estão agrupados em longas unidades e dão origem a extensas unidades transcricionais precursoras, que são sujeitas a processamento (Dunbar *et al.*, 2000). Em alguns tripanosomatídeos, tais genes podem agir em processos de interferência e silenciamento de transcritos nucleolares (Liang *et al.*, 2003).

A RNAPol III de tripanosomatídeos transcreve os genes de tRNA e de todos os outros snRNA, inclusive os snRNA ricos em uridina. Ela reconhece as três classes de promotores (I, II e III) definidas para a RNAPol III de eucariotos superiores (Willis, 1993). Entretanto, o promotor de classe III não se encontra presente nos genes que codificam pequenos RNAs nucleares ricos em Uridina, como os U1-U6 snRNA de tripanosomatídeos. Para transcrevê-los, a RNAPol III se vale do promotor de classe II de um gene de tRNA, localizado à região 5' na outra fita de DNA (Tschudi e Ullut, 2002). Um fato interessante com relação à transcrição do gene U2 snRNA de *T. brucei* é que ele não dispõe de um gene de tRNA adjacente para “tomar-lhe emprestado” o promotor. Contudo, os elementos desse promotor necessários à transcrição estão lá presentes, mesmo na ausência do gene (Fantoni *et al.*, 1994).

O mecanismo de transcrição também está presente na mitocôndria dos tripanosomatídeos. Seus genes estão organizados em estruturas conhecidas como maxicírculos e minicírculos. Os minicírculos possuem genes de RNA guia (gRNA), que participam nos eventos de edição dos RNAs, que se resume na adição ou deleção de uridinas dos transcritos vindos dos maxicírculos. Não foi identificado nos minicírculos ou maxicírculos sequência codificante ou promotora para a RNAPol atuante na mitocôndria (Grams *et al.*, 2002). O que se observa é uma RNAPol codificada no núcleo que transcreve os genes de mRNA dos maxicírculos, mas não se sabe se esta polimerase atua nos genes de gRNA dos minicírculos. De forma

semelhante, todos os tRNAs presentes na mitocôndria não são lá sintetizados, mas são trazidos do núcleo com a utilização de diversos mecanismos de sinalização (Schneider e Maréchal-Drouard, 2000).

Os genes responsáveis por codificarem diversas proteínas nos tripanossomos apresentam-se organizados em grupos contendo repetições em *tandem* tanto de uma mesma fase aberta de leitura (ORF), quanto de ORFs muito similares. Ainda há seqüências intercaladas que não possuem qualquer relação com as primeiras. Vale dizer que tal organização não conta com a presença de íntrons e as regiões que separam cada gene, denominadas seqüências intergênicas, são curtas e flanqueadas por regiões de processamento, cuja distância entre elas é geralmente conservada (Hug *et al.*, 1994). Este agrupamento de genes é transcrito formando extensas unidades policistrônicas (Evers e Cornelissen, 1990) e apesar desta organização, genes individuais pertencentes à mesma unidade policistrônica podem exibir diferentes padrões de expressão (Bringaud e Baltz, 1993), evidenciando que o controle da expressão gênica se dá preferencialmente em nível pós-transcricional.

1.6.1 Controle da Expressão Gênica – Eventos Nucleares

Após a formação de um transcrito primário, é necessário que este seja processado para originar um RNA mensageiro maduro. Este mRNA possui características próprias, como uma seqüência líder na região 5', adicionada por um mecanismo conhecido como *trans-splicing*, e uma cauda poli-A na região 3'. A incorporação destas duas estruturas reflete um dos primeiros níveis da regulação pós-transcricional. Estes processos já foram observados em seqüências alternativas de uma mesma região (Matthews *et al.*, 1994; Schürch *et al.*, 1994). Também parece não haver uma prioridade na ordem dos eventos. No caso do gene da hsp70, foram vistas unidades transcricionais sem a seqüência líder, mas com a cauda poli-A (Huang *et al.*, 1991). No gene da α -tubulina, foi observado o oposto (Ullu *et al.*, 1993). Entretanto, estudos posteriores apontaram para o fato de que tais fenômenos sejam acoplados (LeBowitz *et al.*, 1993; Vassella *et al.*, 1994) e que elementos da região intergênica, como as extensões de polipirimidina, influenciam o sítio de *trans*-

splicing do transcrito seguinte, que por sua vez determina o sítio de poliadenilação do transcrito anterior (Vanhamme e Pays, 1995).

A eficiência do fenômeno do *trans-splicing* parece ser também fortemente influenciada pela quantidade de resíduos de pirimidina na região 5' do transcrito primário (Huang *et al.*, 1991). Outro ponto de destaque é que as extensões de polipirimidina da região intergênica mostram-se fundamentais para que os eventos de *trans-splicing* e poliadenilação de transcritos primários vizinhos ocorram de forma correta, tanto que mudanças nesta região podem influenciar nos níveis de mRNA de ambos os transcritos (Vassella *et al.*, 1994; Berberof *et al.*, 1995). Em muitas células essas regiões parecem ser os alvos prediletos de proteínas envolvidas em modulação pós-transcricional, reforçando a idéia que de fato trata-se deste tipo de controle de expressão gênica (Morris *et al.*, 1993; Norton, 1994).

1.6.2 Controle da Expressão Gênica – Eventos Citoplasmáticos

O balanço entre estabilidade e degradação do mRNA está fortemente presente no cenário da regulação pós-transcricional. Bom exemplo disso são os genes que codificam os três tipos de fosfoglicerato cinase (PGK) de *T. brucei*: PGKA, PGKB e PGKC, enzimas envolvidas na via glicolítica. Todos estão organizados na mesma unidade transcricional contendo outros genes não relacionados. Além disso, são transcritos pela RNAPol II a taxas semelhantes nas formas tripomastigotas e procíclicas, mas o nível de expressão entre elas é completamente diferente. PGKA é bem pouco expressa e tal fato é relacionado à baixa taxa de eficiência da região em que ocorre o *trans-splicing* (Kapotas e Bellofatto, 1993). Já a PGKB é expressa exclusivamente no citosol de formas tripomastigotas procíclicas. PGKC por sua vez é encontrada no glicossomo e expressa quase que exclusivamente nas formas tripomastigotas sangüíneas. O que pode estar modulando esses diferentes níveis de expressão em proteínas muito semelhantes são as informações contidas nas regiões 3' não traduzidas dos transcritos primários (Blattner e Clayton, 1995).

Várias proteínas de ligação à cauda poli-A já foram descritas em tripanosomatídeos (Hotchkiss *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2003) e acredita-se que seu mecanismo geral de ação na degradação do mRNA seja

semelhante ao observado em leveduras e mamíferos. Tais proteínas iniciam o processo de retirada de adeninas da calda poli-A reduzindo-as a poucos nucleotídeos. Isso dispara o complexo de retirada da seqüência líder, seguido por degradação com exonucleases citoplasmáticas no sentido 5'→3'. Por fim, ocorre a degradação no sentido inverso na outra extremidade por um complexo de exonucleases chamado exossoma (Estévez *et al.*, 2001; Butler, 2002).

Em *T. brucei* são conhecidos alguns motivos presentes na região 3' UTR de alguns mRNAs, que atuam no mecanismo de degradação de RNA. No mRNA das VSGs há dois elementos, um contendo 8 e outro 14 nucleotídeos. Eles participam estimulando a expressão em tripomastigotas metacíclicos e suprimindo-a nas formas procíclicas. No caso das prociclinas, mais dois elementos, um de 16 e outro de 26 nucleotídeos, agem respectivamente no aumento da tradução e na regulação da expressão desta proteína nesta fase do parasita (Furger *et al.*, 1997; Hotz *et al.*, 1997). Outro elemento encontrado é uma seqüência rica em uridinas que também regula a expressão em níveis de transcrição e tradução, e assemelha-se bastante com os elementos ricos em adenina e uracila (ARE - *AU rich elements*) de mamíferos (Mitchell e Tollervey, 2000). Em *T. cruzi* foi identificada uma proteína que se liga aos elementos ARE, e quando superexpressa causa a desestabilização do mRNA das mucinas (D'Orso e Frasch, 2001).

Além dos eventos já mencionados no controle da expressão gênica (adição da seqüência líder e da cauda poli-A; estabilidade do mRNA maduro, conferida em parte pelas informações contidas na região 3' UTR e em parte pela ação de moléculas que estimulam ou reprimem a tradução) outro ponto de controle envolve o acoplamento do mRNA com a maquinaria de tradução representada pelos ribossomos, que tem sido designado como mobilização polissomal. Estudos com o gene da metacicloproteína indicaram que ele está sujeito a esse tipo de mecanismo. Análises de *Northern blot* dos mRNA associados a polissomos de populações de *T. cruzi* em multiplicação e em diferenciação revelaram a presença do mRNA apenas na população em diferenciação. Já nas análises de RNA total, pôde-se constatar sua presença em ambas as populações (Ávila *et al.*, 2001). O mesmo tipo de regulação foi vista para uma família de genes que codificam proteínas do tipo ligantes de quitina (*Chitin-binding-like*) na população de *T. cruzi* durante a metacicloproteína (Dallagiovanna *et al.*, 2001).

1.7 LIPÍDIOS NO *Trypanosoma cruzi*

Um ponto de grande interesse em nosso trabalho é a investigação das moléculas lipídicas do *T. cruzi*, em especial as que fazem parte da membrana plasmática. Dados apresentados neste trabalho sugerem que tais moléculas podem estar envolvidas na diferenciação, sobretudo pelas evidentes mudanças morfológicas na superfície das formas metacíclicas, a fim de se transformarem em amastigotas. Apesar da tendência de se atribuir importância cada vez maior aos lipídios, principalmente pelo descobrimento de novas funções fisiológicas, tais moléculas têm sido pouco investigadas em tripanosomatídeos, especialmente quando comparadas à proteína e ácidos nucleicos, por exemplo. Poucos são os grupos que possuem linhas de pesquisa envolvendo lipídios de *T. cruzi*.

Um dos primeiros trabalhos feitos com lipídios de membrana plasmática do *T. cruzi* teve como objetivo comparar os constituintes de membrana de epimastigotas obtidos de duas formas distintas: através de fracionamento celular e purificação da membrana plasmática, e pelo uso de um agente que induzia a formação de vesículas a partir da membrana plasmática, que eram então purificadas. Foram analisadas as quantidades relativas de proteínas, lipídios, fosfolipídios, carboidratos e esteróis. Os dados mostraram proporções diferentes entre constituintes nas duas amostras, com destaque para a razão entre esteróis e fosfolipídios, que está relacionada com a fluidez. Essa razão foi mais baixa na amostra de membrana obtida pela formação de vesículas sendo, portanto, mais fluida. Foi sugerido que o agente formador de vesículas estivesse favorecendo a migração de certos componentes da membrana em detrimento de outros, tornando esse meio de obter amostras de membrana menos adequado que o fracionamento celular (Franco da Silveira e Colli, 1981).

Um estudo semelhante foi feito em promastigotas de *Leishmania donovani* (Wassef *et al.*, 1985) no qual se comparou a constituição lipídica de membranas da superfície celular; de uma fração oriunda de um isolado de mitocôndria/cinetoplasto; e de todo o parasita. A proporção entre as espécies de fosfolipídios variou muito nas três amostras, mas as cadeias de ácido graxo dos fosfolipídios tinham, em sua maior parte, 18 e 20 carbonos, assim como em *T. cruzi* (Timm *et al.*, 1982). Também foi

avaliada a capacidade antigênica das frações glicolípídicas através da produção, em coelhos, de anti-soro para as membranas de superfície.

Alguns fatores externos foram descritos como promotores da mudança na composição lipídica do *T. cruzi*. Bronia e colaboradores (1999) mostraram que o envelhecimento dos parasitas na cultura pode provocar esse efeito. Epimastigotas em crescimento exponencial, em fase estacionária e em fase de declínio apresentaram queda geral na quantidade de fosfolipídios ao longo das fases, com aumento de insaturações em liso-fosfatidilcolina e acilglicerídeos e diminuição em fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Esteróis e acilglicerídeos ficaram mais abundantes, tornando a membrana menos fluida. O fator temperatura foi descrito como capaz de mudar a composição lipídica de epimastigotas e metacíclicos passados de 28 para 37 °C e cultivados por até 48 h (Florin-Christensen *et al.*, 1997). Em epimastigotas foi visto um aumento na proporção de triacilgliceróis e de esteril ésteres. Já fosfatidilcolina e fosfatidilinositol diminuíram com 48 h, a 37 °C. Em metacíclicos, as proporções de esteróis, triacilgliceróis e esteril ésteres aumentaram. O grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios também diminuiu com o aumento da temperatura em epimastigota e metacíclicos, indicando uma possível mudança na atividade das enzimas que introduzem insaturações.

Os lipídios dos demais estágios evolutivos do *T. cruzi* também foram estudados quanto à composição dos ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros (Kaneda *et al.*, 1986). Posteriormente, foi investigada a composição de ácidos graxos durante o processo de metaciclogênese e constatou-se que as mudanças mais significativas ocorreram durante as etapas iniciais, sem que praticamente nenhuma alteração morfológica nos epimastigotas houvesse ocorrido (Esteves *et al.*, 1989). O papel dos ácidos graxos seria mais tarde ampliado para elemento promotor da metaciclogênese, conforme sugerido por Wainszelbaum e colaboradores (2003). Os autores mostraram que os ácidos graxos livres presentes em extratos do trato intestinal de insetos triatomínicos eram fundamentais na metaciclogênese. Quando os epimastigotas eram incubados na presença desse extrato, em que a fração de ácido graxo havia sido removida, a metaciclogênese não ocorria, mas quando a fração era adicionada, o quadro se revertia.

O envolvimento de enzimas ligadas ao metabolismo de lipídios tem sido descrito como fundamental no processo de amastigogênese. Um tipo de fosfolipase C foi identificado em *T. cruzi* e descrito como específica para fosfoinosítídeos, além de conter uma modificação lipídica que permite sua ancoragem na membrana plasmática (Nozaki *et al.*, 1999; Furuya *et al.*, 2000). As fosfolipases C participam na via de ativação por Cálcio liberando dois mensageiros intracelulares, o diacilglicerol e o inositol-3-fosfato. Foi observado que essa enzima encontrava-se mais expressa durante a diferenciação para amastigota, o que contribuiu para o questionamento sobre sua participação neste processo. Por fim, os autores mostraram que em células onde sua expressão era regulada negativamente através de inibição anti-senso, a diferenciação para amastigota era diminuída. Por outro lado, a superexpressão do gene em células transfectadas aumentava a taxa de amastigogênese.

Cada vez mais os lipídios ganham importância na compreensão de fenômenos relevantes para os tripanosomatídeos. Neste trabalho, um esforço considerável foi feito na tentativa de caracterizar os lipídios totais e de membrana plasmática dos principais estágios do *T. cruzi*. O crescente conhecimento de sua participação em fases vitais para o parasita, como a diferenciação, coloca ainda mais essas moléculas no alvo do desenvolvimento de novas terapias e aperfeiçoamento das já existentes.

2 OBJETIVOS

Este trabalho se vale da metodologia de obtenção de formas amastigotas axênicas do *Trypanosoma cruzi* (Contreras *et al.*, 2002) para investigar alguns fenômenos presentes nesse processo estratégico. Assim, os objetivos apontados neste estudo são:

- Obter formas amastigotas do clone Dm28c a partir da diferenciação de tripomastigotas metacíclicos com a metodologia de amastigogênese extracelular;
- Caracterizar as alterações morfoestruturais sofridas pelo *T. cruzi* durante o processo de amastigogênese;
- Caracterizar, por espectrometria de massas, a composição lipídica total e de superfície do *T. cruzi* durante a amastigogênese, comparando-a com demais estágios evolutivos.
- Caracterizar, de maneira geral, o perfil da expressão gênica nos diferentes estágios do *T. cruzi* e identificar os genes diferencialmente expressos ao se comparar as formas multiplicativas amastigota e epimastigota, por meio de microarranjos de DNA;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES E MATERIAIS

Ambion: Kit “Amino Allyl MessageAmp™ aRNA”

Amicon: Microcon 30

Amersham-Pharmacia Biotech: dCTP-Cy3; dCTP-Cy5; dNTPs; RNase H; Taq DNA polimerase

Appligene: Proteinase K

Arcturus: *kit PicoPure™*

BioRad: agarose; azul de bromofenol; xilenocianol

Corning: Lâminas para microarranjo CMT GAPS

Cult-lab: soro fetal bovino

Difco: extrato de levedura; infuso de fígado; triptose

Gibco: gentamicina; RPMI-1600; solução de aminoácidos (MEM *non-essential aminoacids*)

Invitrogen: *kit “BioPrime DNA Labeling System”*; DTT; EDTA; *RNA ladder*; hexâmeros aleatórios; sacarose; *Superscript™ II*; *RNase OUT™*

Merck: acetato de sódio; ácido acético; ácido bórico; ácido clorídrico; álcool isoamílico; citrato de sódio; cloreto de cálcio; cloreto de lítio; cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; clorofórmio; etanol absoluto; fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de sódio; glicose; hidróxido de sódio; maltose; SDS; sulfato de amônia; sulfato de magnésio

Microbiológica: hemina

Millipore: colunas *microcon 30 (Microcon® Amicon Bioseparations)*

TPP: garrafas para cultivo de células

Promega: DNase RQ1 (livre de atividade tipo RNase); *RNAasin®*

Qiagen: *QIAquick 96 PCR purification kit*; *RNeasy®*, RNase-free DNase set

Sigma: β-mercaptoetanol; ácido L-aspartico; ácido L-glutâmico; ampicilina; brometo de etídeo; BSA; cicloheximida; coquetel de inibidores de protease; DEAE-

celulose; DEPC; DMSO; DNA de esperma de salmão; ficoll; formaldeído; formamida; heparina; hepes; L-prolina; NP-40; polivinilpirrolidona; *RNA sample buffer*

USB: MOPS; sacarose

3.2 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

Colchão de sacarose: sacarose 2 M, em tampão de lise celular hipotônico

H₂O: A água utilizada em todos os procedimentos era proveniente do sistema de filtragem milli-Q (Millipore). A água utilizada para procedimentos com RNA era tratada com dietil pirocarbonato (DEPC)

Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*): extrato de levedura 15 g/l; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l; glicose 2,2 g/l; hemina 0,02 g/l; infuso de fígado 5 g/l; KCl 0,4 g/l; NaCl 4,4 g/l; soro fetal bovino 10 % (v/v) e triptose 5 g/l. pH 7,2 ajustado com HCl

Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*): CaCl₂ 2 mM; KCl 17 mM; MgCl₂ 2 mM; NaCl 190 mM; tampão fosfato pH 6,0 8 mM

Meio TAU3AAG: TAU suplementado com: ácido L-aspártico 2 mM, ácido L-glutâmico 50 mM, L-prolina 10 mM e glicose 10 mM

Meio MEMTAU: TAU3AAG (pH 6,0) 0,429 X; MEM sem Hepes e bicarbonato 0,429 X; MES 20 mM; sacarose 70 mM; hemoglobina 1% (p/v); soro fetal bovino 5-10% (v/v)

Solução de Denhardt (50 X): albumina bovina sérica (BSA) fração V 1 % (p/v); ficoll 400 1 % (p/v) e polivinilpirrolidona 1 % (p/v)

Solução de PSG: Na₂HPO₄ 47,46 mM; NaH₂PO₄ H₂O 2,5 mM; NaCl 36,32 mM; glicose 55,5 mM

Solução para desnaturação: NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M

Solução para hibridização dos microarranjos: SSC 6 X; Denhardt's 5 X; DNA de esperma de salmão tipo III fragmentado e desnaturado 0,25 mg/ml; SDS 0,5 % (p/v) e formamida 50 % (v/v)

SSC (*standard saline-citrate*) (20 X): citrato de sódio pH 7,0 0,3 M e NaCl 3 M

Tampão de lise celular hipotônico: β-mercaptoetanol 5 mM; cicloheximida 10 µg/ml; heparina 20 U/ml; MgCl₂ 5 mM; NaCl 10 mM e tris-HCl pH 7,6 10 mM

Tampão MOPS: acetato de sódio 5 mM pH 7,0; EDTA pH 8,0 2 mM; MOPS 20 mM

Tampão NKM: cicloheximida 10 µg/ml; heparina 20 U/ml; hepes pH 7,4 10 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 1,5 mM e NaCl 140 mM

Tampão para aplicação de amostras de RNA em gel: corante – MOPS 1 X, glicerol 25 % (v/v), azul de bromofenol 0,25 % (p/v) – 15% (v/v); formaldeído 6 % (v/v); formamida 80 % (p/v) e tampão MOPS 1 X

Tampão PBS (10 X): KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 4,3 mM e NaCl 137 mM

3.3 CULTIVO E OBTENÇÃO DO *Trypanosoma cruzi*

Epimastigota:

Os epimastigotas (clone Dm28c) são armazenados em N₂ líquido e a cada seis meses um novo clone é descongelado e cultivado. Os epimastigotas são mantidos através de repiques realizados semanalmente em 100 ml de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), na concentração aproximada de $6,0 \times 10^4$ parasitas/ml, a 28 °C. Ao fim de sete dias as células encontram-se em fase estacionária de crescimento. Para obter epimastigotas em fase exponencial de crescimento, foram feitos inóculos na concentração de 10^6 parasitas/ml em 100 ml de LIT. Após três dias de crescimento a 28 °C a cultura alcançou uma concentração de 3×10^7 parasitas/ml. Outro repique nestas mesmas condições foi feito antes de utilizar os epimastigotas em fase de crescimento exponencial, também designados “Epi 3 dias”.

Tripomastigota metacíclico:

Tripomastigotas metacíclicos foram obtidos de uma cultura de “Epi 3 dias” em que o cultivo foi prorrogado até que as células entrassem em fase de crescimento estacionário, que ocorre por volta do quinto dia, chegando a concentração aproximada de 6×10^7 parasitas/ml. Essas células foram submetidas a um estresse nutricional ao se remover o meio LIT e se adicionar o meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*), incubando por 2 h, a 28 °C. Em seguida, elas foram

inoculadas em garrafas de cultura contendo meio TAU3AAG, numa taxa de 5×10^6 parasitas/ml e cultivados a 28 °C. Após três dias, em torno de 70% das células no sobrenadante da cultura já estavam diferenciadas em tripomastigotas metacíclicos. As células do sobrenadante foram concentradas e suspensas em solução de Hank Hepes Carbonato. O volume foi duplicado com a adição de soro fresco estéril de cobaia numa concentração final de 5×10^8 células/ml. A lise dos epimastigotas pelo complemento ocorreu durante a incubação por 30 min. em banho-maria a 37 °C. Feito isso, as células foram lavadas em solução de PSG e submetidas à coluna contendo 8 ml da resina DEAE-50, numa razão de até 2×10^9 células/coluna. Os epimastigotas, lisados ou não, foram retidos pela resina enquanto os tripomastigotas metacíclicos, coletados e lavados com a solução de interesse, após o que estavam prontos para uso.

Amastigota Intracelular:

A forma amastigota intracelular foi obtida por meio de infecção de células Vero, cultivadas em garrafas com superfície de adesão de 150 cm², em estágio semi-confluyente, a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. $1,5 \times 10^6$ formas tripomastigotas, oriundas de cultura de células, foram inoculadas em cada garrafa e após 24h, os parasitas livres no sobrenadante removidos para a troca do meio RPMI-1600, suplementado com 5% de SFB. Após sucessivos ciclos de infecção, diferenciação para amastigotas, multiplicação, diferenciação para tripomastigotas e novamente infecção, as células hospedeiras foram sendo invadidas e destruídas, resultando no início da liberação dos tripomastigotas no quarto dia pós-infecção. A partir deste ponto, o sobrenadante composto por tripomastigota e amastigota foi coletado a cada 24 h até o oitavo dia, momento em que havia enriquecimento de formas amastigotas na cultura. Tais amastigotas foram coletados, lavados e utilizados.

Amastigota Extracelular:

A forma amastigota extracelular foi obtida segundo (Contreras *et al.*, 2002) com algumas modificações. 5×10^8 tripomastigotas metacíclicos purificados foram incubados em 33 ml de meio MEMTAU a 37 °C, enriquecido com 5% de SFB, contidos em uma garrafa de cultura de 150 cm² (TPP) e cultivados por três dias

numa atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, as células foram lavadas, divididas em duas garrafas de cultura contendo meio de cultura fresco com 10% de SFB, o que favoreceu uma maior multiplicação dos amastigotas e conseqüente expansão da cultura. Após dois dias sob as mesmas condições, a grande maioria dos amastigotas se encontrava sedimentada na garrafa de cultura, enquanto que os tripomastigotas metacíclicos não diferenciados e os restos celulares, suspensos. Após remoção cuidadosa do meio de cultura, sem perturbar o sedimento rico em amastigotas, os mesmos foram coletados, lavados e quantificados (representando mais de 90% das células presentes), estando prontos para serem usados.

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO Ssp-4

Os amastigotas extracelulares foram analisados por *Western blot* para verificar a expressão do antígeno Ssp-4, específico para amastigotas. Esta é a principal glicoproteína de amastigotas, com massa molecular de 84 kDa e ancorada por GPI (Andrews *et al.*, 1987; Andrews *et al.*, 1988). Uma amostra de 5×10^8 amastigotas extracelular e intracelular foram lavados duas vezes em PBS (centrifugação a 5.000 g, por 5 min., a 10 °C) e lisados em tampão de amostra para proteína, numa concentração final de 5×10^5 células/μl. As amostras foram submetidas a 10% SDS-PAGE e transferidas por 16 h para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences), segundo protocolo padrão (Towbin, 1979). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio por 1 h e em seguida incubada com o anticorpo monoclonal α-Ssp4 (gentilmente cedido pela Doutora Norma W. Andrews) por 2 h, a 37 °C. Após três lavagens de 5 min. em TBST, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma), diluído 1:7.500 em solução de bloqueio para *Western blot*. A membrana foi lavada em tampão de fosfatase alcalina e os anticorpos ligados foram revelados através da reação da fosfatase alcalina utilizando como substratos o BCIP (50 μg/ml) e o NBT (50 μg/ml) (Promega).

3.5 MICROSCOPIA ÓPTICA

O acompanhamento do cultivo celular foi feito por meio de microscopia de contraste de fase, utilizando microscópios com iluminação convencional (Nikon Eclipse E 600 e E 400) e invertida (Nikon Eclipse TS 100 e TE 300). As Imagens foram obtidas por meio do sistema de captura de imagem *CoolSNAP-PRO color*.

Para microscopia confocal, as células marcadas com biotina (método descrito abaixo) foram fixadas em solução de paraformaldeído a 1% em PBS, por 40 min. à temperatura ambiente e lavadas três vezes em PBS. Então, foram incubadas primeiramente em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (PBS/BSA 1%), por 1 h. Em seguida a incubação se fez com 10 µg/ml de estreptavidina conjugada ao fluoróforo Alexa 488 em PBS/BSA 1%, por 30 min. à temperatura ambiente, no escuro. As células foram lavadas três vezes em PBS e dispostas entre lâmina com o uso de Vectashield (Vector) como meio de montagem. Os parasitas foram observados no aparelho Zeiss LSM 5 PASCAL Laser Scanning Microscope e as imagens obtidas e analisadas com o equipamento Zeiss LSM Image Examiner.

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As células foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído e tampão cacodilato 0,1 M; pós-fixadas por 1 h em solução de 1% de tetróxido de Ósmio e 0,8% de ferricianeto de Potássio, diluídos em tampão cacodilato 0,1 M; desidratadas em solução contendo concentrações crescentes de acetona e incluídos em Epon. Após a obtenção de cortes ultrafinos dos parasitas, os mesmos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de Chumbo antes de serem observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os parasitas foram aderidos à lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina, lavados com PBS e fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de

paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1 M; pós-fixados por uma hora em solução de 1% de tetróxido de Ósmio em tampão cacodilato 0,1 M; desidratados em solução etanol:água com concentrações crescentes de etanol e secos pelo método do ponto crítico. As células foram metalizadas com ouro antes de serem observadas e fotografadas pelo microscópio eletrônico de varredura Jeol 5310 e pelo microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (FE-SEM) Jeol 6340.

3.8 OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS DO *T. cruzi*

Após a obtenção dos diferentes estágios evolutivos do *T. cruzi*, todos foram submetidos à liofilização para preservar os lipídios antes de serem extraídos. Os passos de delipidação (Almeida *et al.*, 2000) constavam de homogeneização (agitação por 1 min.) do material liofilizado em solução de clorofórmio:metanol (2:1), num volume dez vezes maior que o de parasitas liofilizados, seguido por centrifugação a 500 *g* e coleta da fase orgânica em tubos novos, de vidro âmbar com tampa de Politetrafluoretileno (PTFE). Este procedimento foi repetido três vezes. Na seqüência, sob o mesmo modo, eram usadas as seguintes proporções (Vol./Vol.) de clorofórmio:metanol: 1:1; 1:2; e por fim 1:2:0,8 (clorofórmio:metanol:água). A extração utilizando esta última solução era feita duas vezes, com a fase orgânica coletada e guardada separadamente da demais. As fases orgânicas foram então secas sob um fluxo de N₂ e suspensas em 2 ml de clorofórmio:metanol (1:1).

3.9 ANÁLISE DOS LIPÍDIOS TOTAIS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (ESI-MS)

Antes de submeter uma amostra à corrida no espectrômetro de massas (ESI-Q-TOF-MS, Q-tof1, Micromass/Waters), uma alíquota foi retirada e a ela adicionado hidróxido de Lítio (10 mM) para corridas em modo positivo, ou formiato de amônia (0,1%) para corridas realizadas em modo negativo. O espectro total era coletado primeiro e em seguida o espectro de fragmentação dos picos mais

abundantes, com m/z entre 400 e 1500. Os resultados foram analisados utilizando os programas *MassLynx* 4.0 e *ChemSketch ACD Freeware* 10.0.

3.10 MARCAÇÃO COM BIOTINA

As células a serem marcadas com biotina (Pierce) foram coletadas e lavadas duas vezes em PBS a 4 °C. Foi adicionado 1 mM de biotina em PBS (pH 7,4) por 30 min. a 4 °C, o que diminui as chances de incorporação da biotina pela célula. Os parasitas foram lavados três vezes com PBS a 4 °C contendo 100 mM de glicina, para remover a biotina excedente e bloquear a biotina ligada. Após a marcação com biotina, as células seguiam em experimentos com diferentes abordagens, como microscopia confocal, *Western blot* e obtenção de lipídios de membrana plasmática.

3.11 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS EM EXTRATOS DE *T. cruzi*

Um total de 5×10^8 epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos e amastigotas foram coletados e lavados duas vezes em PBS a 4 °C. As células de cada estágio foram divididas igualmente em dois tubos, um para ser incubado com biotina e outro não. Todos os tubos foram manipulados da mesma maneira. As células foram marcadas com biotina e em seguida lisadas com a adição de tampão de amostra para proteína. O volume foi corrigido para se ter 5×10^5 células/ μ l. Dez microlitros de cada amostra foram submetidos a 10% SDS-PAGE seguindo com o ensaio de *Western blot* conforme já descrito, excluindo a fase de incubação com anticorpo primário. Na etapa correspondente à incubação com o anticorpo secundário, foi usado estreptavidina conjugada com peroxidase. A revelação da marcação foi feita por quimiluminescência.

3.12 OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE EPIMASTIGOTA DO *T. cruzi*

Aproximadamente 10^{10} epimastigotas cultivados por três dias foram coletados e lavados duas vezes em PBS a 4 °C e marcados com biotina, conforme o item 3.10. Em seguida, foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (Sigma, P2714) segundo recomendações do fabricante, totalizando um volume de 3 ml, seguido por três ciclos de lise através de congelamento (banho de gelo seco) e descongelamento (banho-maria 37 °C). O extrato foi centrifugado a 16.000 g, por 15 min., a 4 °C e o sobrenadante utilizado para incubação com a resina agarose-avidina por 1 h, a 4 °C sob leve agitação. A fase aquosa foi coletada e a resina lavada com 30 ml das seguintes soluções: PBS, PBS NaCl 0,5 M e NH_4Ac 100 mM. Feito isso, a resina foi usada para extrair os possíveis lipídios nela ligados, segundo Bligh & Dyer (two-step method – <http://www.cyberlipid.org/extract/extr0006.htm#3>). Em uma amostra aquosa de 1 ml foi adicionado 3,75 ml de clorofórmio:metanol (1:2) seguido por 5 min. de agitação no vortex. Então, adiciona-se 1,25 ml de clorofórmio, agita-se por 1 min, adiciona-se 1,25 ml de água e agita-se por mais 1 min. A amostra foi centrifugada e a fase inferior coletada em um novo tubo. À fase superior foi adicionado 1,88 ml de clorofórmio, seguido por agitação e centrifugação. A fase inferior foi novamente coletada e misturada à primeira. Após a evaporação dos solventes com o auxílio de N_2 , o extrato lipídico é suspenso em um pequeno volume de clorofórmio:metanol (2:1) antes de ser analisado no espectrômetro de massas.

3.13 OBTENÇÃO DE RNA POLISSOMAL DE *T. cruzi*

Após a obtenção das formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, amastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares, foram adicionados ao meio de cultura 10 µg/ml de cicloheximida, incubando-se por 30 min., a 4°C. As células foram lavadas duas vezes com tampão NKM em centrifugações a 8.000 g, por 10 min., a 4°C. A quantidade aproximada de 5×10^{10} epimastigotas e 10^9 tripomastigotas e amastigotas foram incubadas em 10 ml de tampão de lise celular hipotônico, contendo 10 µg/ml de cicloheximida, 20 U/ml de heparina, 5 mM de β -

mercaptoelanol e 1% (Vol./Vol.) de Nonidet P-40, por 5 min., a 4°C. Com o choque hipotônico, as células, que adquiriam aspecto inchado e arredondado, foram homogeneizadas em agitadores tipo vortex até adquirirem uma morfologia em que se podia observar o contorno celular, o interior translúcido com o núcleo bem destacado ao centro e a formação de grumos celulares. Neste ponto a lise foi interrompida com a adição de solução de 0,25 M de sacarose, contendo 10 µg/ml de cicloheximida, 20 U/ml de heparina, 5 mM de β-mercaptoelanol. Uma centrifugação a 9.000 g, por 10 min., a 4°C foi feita para sedimentar os núcleos. Outra, nas mesmas condições, por 30 min., foi feita para sedimentar as mitocôndrias. O sobrenadante da fração pós-mitocondrial foi aplicado cuidadosamente sobre um colchão de sacarose a 2 M (contendo 10 µg/ml de cicloheximida, 20 U/ml de heparina, 5 mM de β-mercaptoelanol) e centrifugado a 36.500g, por 2 h, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo as moléculas de RNA associadas a polissomos, guardado a -70°C até o instante em que foi submetido a limpeza com o *kit* RNeasy acoplado-se o tratamento com DNase (*RNase-free DNase set*-Qiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.14 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS

A quantidade de DNA ou RNA foi determinada através da medição da absorbância a 260 nm, considerando que o valor da absorbância igual a 1 equivale a 50 µg/ml de DNA e 40 µg/ml de RNA. A qualidade dos ácidos nucleicos foi determinada fazendo-se a razão entre a absorbância a 260 e a 280 e, quando havia quantidade de RNA suficiente, através de uma eletroforese em gel de agarose à concentração de 1% com formaldeído em tampão MOPS, observando-se as bandas de rRNA ou, no caso do RNA amplificado, a faixa de tamanho do material gerado.

3.15 TRATAMENTO COM DNase

100 µg de cada amostra de RNA foram mantidos a 37 °C, por 30 min., com 10 U de DNase RQ1, em solução contendo 100 µg/ml de BSA, 0,05 % de DTT, 10

mM de $MgCl_2$, 50 mM de NaCl, 1 U/ μ l de RNasin[®] e 50 mM de tris-HCl pH 8,0. A seguir, a amostra foi aquecida a 70 °C, por 10 min. O produto desta digestão foi purificado no sistema *RNeasy*, segundo as especificações do fabricante.

3.16 PURIFICAÇÃO DE RNA ATRAVÉS DE *RNeasy* (QIAGEN)

Amostras de RNA tratadas com DNase foram purificadas conforme o protocolo “RNA *cleanup*” do *kit*. Sedimentos de RNA polissomal, após a passagem pelo colchão de sacarose, foram purificados seguindo-se o protocolo “*Animal Cells I*” com o passo adicional de tratamento com DNase na própria coluna (*RNase-free DNase set* – Qiagen), seguindo-se as especificações do fabricante.

3.17 AMPLIFICAÇÃO *IN VITRO* DE RNA

A amplificação do RNA foi realizada utilizando-se o *kit* Amino Allyl MessageAmp[™] aRNA (Ambion). Brevemente, a 1ª fita de cDNA foi gerada em uma reação com oligodT-promotorT7, *first strand buffer*, inibidor de RNase, dNTPs e transcriptase reversa, conforme volumes definidos pelo fabricante, por 2 h, a 42°C. A segunda fita do cDNA foi sintetizada em uma reação com *second strand buffer*, dNTPs, DNA polimerase e RNase H, conforme volumes definidos pelo fabricante, por 2 h, a 16 °C. O cDNA foi purificado em colunas de afinidade do próprio *kit* e a transcrição ocorreu adicionando-se NTPs 10mM, T7 *reaction buffer* e T7 *enzyme mix*, por 14 h, a 37°C. Após esta incubação, o DNA foi degradado com DNase I. O RNA foi purificado em colunas de afinidade do próprio *kit*.

A quantidade e pureza do RNA foram determinadas conforme item 3.14.

3.18 CONFECÇÃO DO MICROARRANJO DE DNA

São várias as etapas a serem cumpridas para se chegar a uma lâmina de microarranjo pronta para ser hibridizada. Optamos por priorizar o foco na descrição de conceitos em vez de procedimentos e detalhes técnicos envolvidos nas etapas de

confecção, hibridização e análise do microarranjo. Tais procedimentos podem ser encontrados no trabalho realizado por Probst (2005).

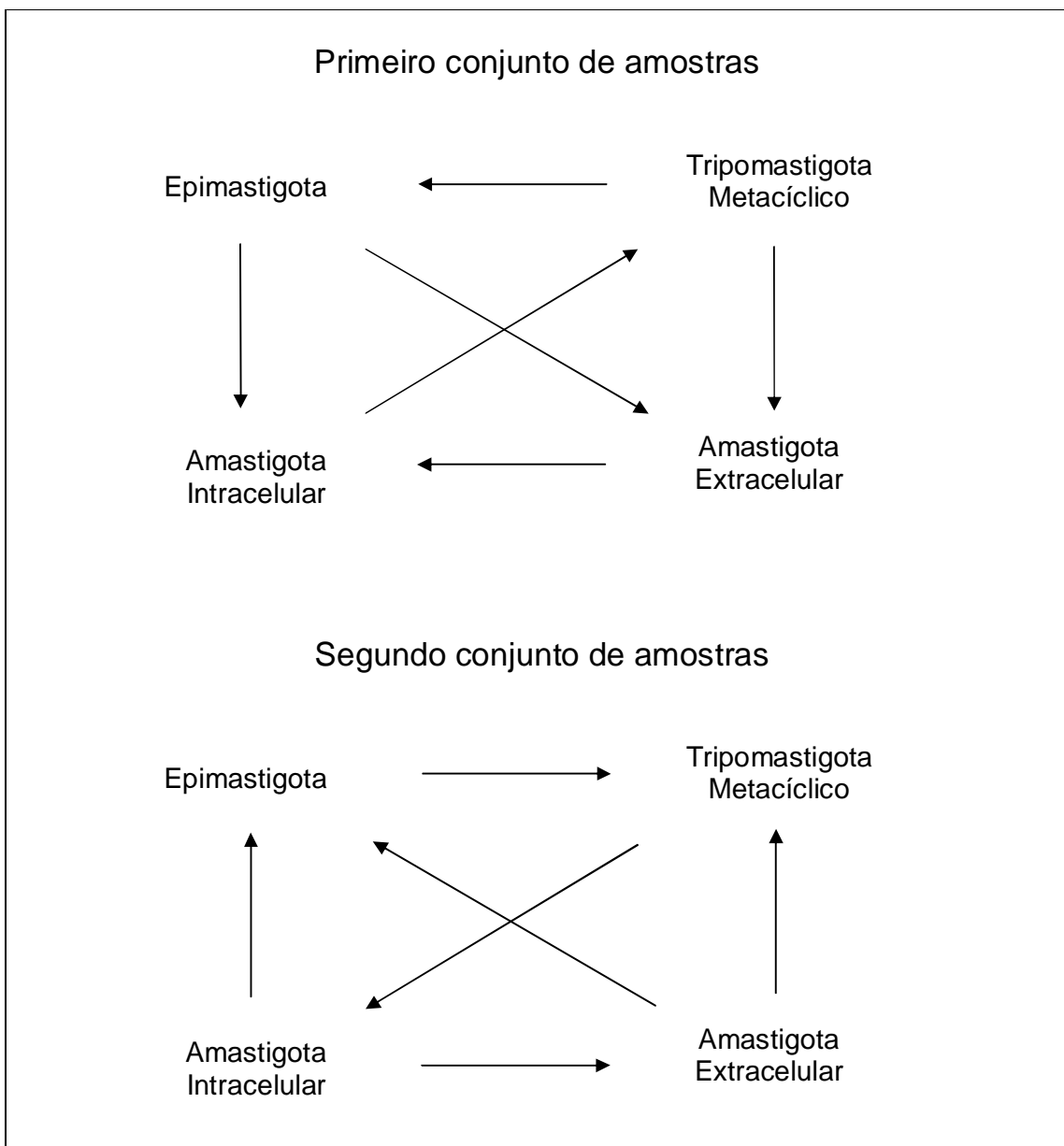
A versão do microarranjo utilizado foi a 5.0, produzido no próprio IBMP. Ele conta com 10,5 mil sondas cobrindo aproximadamente 8 mil genes do *T. cruzi*. Esses *spots* foram preenchidos com sondas amplificadas de diversas fontes como DNA genômico de *T. cruzi*, bibliotecas de EST de diferentes estágios do *T. cruzi*, genes de interesse estudados por nosso grupo, além dos controles internos e externos exigidos em experimentos deste tipo. As sondas de interesse selecionadas a partir de diferentes origens foram amplificadas por reações de PCR, nas quais foram usados iniciadores desenhados para uma eficiente hibridização a 55 °C. O tamanho das sondas varia entre 150 e 600 nucleotídeos. Após a amplificação, as sondas foram purificadas com *kit* comercial (*QIAquick 96 PCR purification kit* – segundo instruções do fabricante), secas e diluídas em DMSO a 50%. O próximo passo foi depositá-las nas lâminas de vidro com o auxílio do robô *Genetix MiniQArray* e fixá-las por meio de exposição à luz ultravioleta. A etapa de anotação das sondas, ou seja, a atribuição de que determinada sonda corresponde a determinado gene, é fundamental para o correto entendimento da biologia retratada pelo microarranjo. Erros podem ser facilmente cometidos neste ponto: cada sonda representa um ou mais genes que nem sempre são conhecidos e anotados; a complementariedade entre sonda e gene pode não ter sido precisa, levando um outro gene (não esperado) a hibridizar-se no lugar do gene original etc. Para aperfeiçoar o processo de anotação das sondas, foi usado o *software* *CruziGeneDB*, desenvolvido no próprio IBMP, que disponibiliza várias informações sobre as sondas, os genes e possibilita análises na relação sonda/gene, diminuindo bastante a probabilidade de erros existentes na etapa de anotação das sondas.

3.19 MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS COM FLUORÓFOROS E HIBRIDIZAÇÃO

As amostras de cRNA foram convertidas em cDNA numa reação de retro-transcrição (hexâmeros aleatórios/Invitrogen; dNTP, *ImProm-IITM* Reverse Transcriptase/Promega; RNase OUT/Invitrogen), seguido pela degradação do RNA (0,1 N de NaOH) e concentração e purificação das amostras em colunas Microcon

30 (Amicon). Durante a síntese da segunda fita (*kit BioPrime DNA labelling System*), os fluoróforos dCTP-Cy-3 ou dCTP-Cy-5 foram incorporados (*kit Amino Allyl MessageAmpTM aRNA*). Em seguida, as amostras cDNA foram lavadas (colunas Microcon 30), desnaturadas e aplicadas sobre a lâmina de microarranjo já devidamente posicionada na estação de hibridização. A hibridização ocorreu na estação *GeneTAC HybStation - PerkinElmer* por 16 h, a 42 °C de modo totalmente automático. Um esquema do desenho das hibridizações pode ser visto na figura 2. O conjunto 1 de hibridizações foi composto pelas seguintes amostras, cada uma hibridizada com as demais: MP05 (tripomastigota metacíclico), EP30 (Epimastigota), AEP11 (amastigota extracelular) e AIP03 (amastigota intracelular). O conjunto 2, pelas amostras MP02, EP26, AEP07 e AIP04, cada uma hibridizada com as demais. Ao fim, o número de hibridizações totalizou doze.

FIGURA 2 – ARRANJO DE HIBRIDIZAÇÕES



Cada flecha representa uma hibridização; a amostra de onde ela sai foi marcada com Cy3 e a amostra para onde ela vai foi marcada com Cy5. Este arranjo feito com dois conjuntos distinto de amostras biológicas.

3.20 LEITURA, ANÁLISE E TRATAMENTO DAS IMAGENS E SINAIS OBTIDOS

Após as lavagens pós-hibridização, as lâminas foram secas por centrifugação e escaneadas usando o sistema *Array Express* (Perkin Elmer). O sistema conta com um *laser* e dois canais com faixas de comprimentos de onda específicos para excitar os fluoróforos Cy3 e Cy5. A fluorescência emitida pelos fluoróforos é captada por um detector. A imagem formada por cada comprimento de onda foi registrada em formato TIFF e utilizada posteriormente nas análises utilizando o programa *Spot* (Beare e Buckley, 2004). Este *software* determina o posicionamento, a área e as fronteiras de cada *spot* para cada canal de fluorescência, criando uma máscara formada pelos *spots* do microarranjo. Em seguida, o *software* R (*R Development Core and Team*) foi usado para remover dos *spots* a fluorescência inespecífica presente no restante da lâmina. A cada *pixel* de um *spot* é atribuído um valor numérico que varia de 0 a 65.535 (2^{16}), de acordo com a intensidade de fluorescência de cada um deles. O valor atribuído a um *spot* é determinado pela mediana dos valores dos *pixels* que o compõe. O *software* Bioconductor (Dudoit *et al.*, 2003) foi usado para transformar os valores de intensidade em logaritmo de base dois.

3.20.1 Normalização dos Dados

Os dados de intensidade de fluorescência do microarranjo devem ser normalizados antes de serem comparados para determinar a ocorrência de expressão diferencial. Isso se faz necessário porque há grandes diferenças na quantidade absoluta de mRNA entre diferentes estágios morfológicos do *T. cruzi*. Somado a isso, passos intermediários do processo como amplificação de mRNA, marcação com fluoróforos e hibridização, são susceptíveis a variação, com conseqüente introdução de erros. Na etapa de obtenção das imagens do microarranjo, todas essas variáveis podem contribuir para a geração de um sinal mais forte nos estágios do *T. cruzi* em que determinado mRNA seja mais abundante, sem que isso de fato represente um padrão aumentado de expressão quando comparado aos demais mRNA deste mesmo estágio. Assim, algumas regras foram

aplicadas para tornar os dados conseguidos até esta etapa do microarranjo mais próximos aos níveis de mRNA presentes nas amostras iniciais.

O *software* utilizado para a normalização foi o LIMMA (Smith, 2004). O critério escolhido foi o de normalização global não-linear pelo método de loess, um método conservador que maximiza a semelhança entre as amostras e que leva em conta outras variáveis no momento da normalização, como o pino utilizado para depositar a sonda, a intensidade média do *spot* ou/e a região do microarranjo na qual a sonda foi depositada. A normalização foi feita em cada lâmina do microarranjo e em seguida entre lâminas, a fim de corrigir as diferenças de intensidade média em cada lâmina por meio da equalização das curvas de distribuição de intensidade das sondas de todos os microarranjos de um experimento.

3.20.2 Questão da Replicação Interna

Em virtude da quantidade de sondas presentes nesta versão do microarranjo, não houve espaço físico para a espotagem de réplicas internas. Entretanto, por meio das diferentes hibridizações feitas com o mesmo estágio numa mesma réplica biológica (ex: Epimastigota x Metacíclico; Epimastigota x Amastigota Intracelular; Epimastigota x Amastigota Extracelular), foi possível estabelecer comparações indiretas entre as amostras várias vezes hibridizadas (Epimastigota no exemplo citado), de modo a considerá-las, para fins de cálculo estatístico, como se fossem réplicas técnicas.

3.21 IDENTIFICAÇÃO DAS DIFERENÇAS NAS COMPARAÇÕES DE INTERESSE

A fim de comparar duas amostras para saber quais genes foram diferencialmente expressos, foi aplicado o teste SAM (*Significance Analysis of Microarrays*, Tusher *et al.*, 2001), uma versão modificada do teste *t* de Student que contempla em suas análises as peculiaridades presentes em experimentos de microarranjo. Nestas análises, foi estipulado um padrão de correção para múltiplos testes chamado de FDR (*false discovery rate* – Benjamini e Hochberg, 1995), que em termos práticos, revela a proporção esperada de falsos positivos dentre os genes designados diferencialmente expressos. O valor de FDR escolhido foi de 5%.

3.21.1 Identificação de Genes Diferencialmente Expressos entre Epimastigota e Amastigota Extracelular

Após a aplicação do teste SAM, foi possível visualizar os genes diferencialmente expressos quando comparadas às formas Amastigota Extracelular e Metacíclica. Dois parâmetros de *fold change* - FC (o número de vezes em que um gene difere em nível de expressão entre duas amostras em comparação) foram adotados nas análises para cada amostra biológica: primeiro um FC de duas vezes, que gerou certa lista de genes, e depois um FC de três vezes, que gerou uma outra lista de genes. Com base nos genes revelados nestas análises, uma regra foi criada para comparar e classificar todos os genes considerados diferencialmente expressos nas duas amostras biológicas. Para isso, foram estabelecidos três níveis de classificação para genes mais expressos em Amastigota Extracelular em relação à Metacíclica: A, B, C. Para genes mais expressos em Metacíclica que em Amastigota Extracelular, a classificação é “-A”, “-B” e “-C”. Os significados são:

“A” - certo gene teve uma expressão maior ou igual a três vezes em ambas as amostras biológicas;

“B” - certo gene teve uma expressão maior ou igual a duas vezes em uma das amostras biológica, e uma expressão maior ou igual a três vezes na outra;

“C” - certo gene teve uma expressão maior ou igual a duas vezes em ambas as amostras biológicas.

Há ainda a classificação “X”, significando que houve discrepância nos dados, ou seja, em uma das amostras biológicas, certo gene aparece mais expresso em Metacíclica, e na outra, mais expresso em Amastigota Extracelular.

3.22 AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO

O agrupamento hierárquico tem como finalidade reunir os genes presentes em um microarranjo com base nas variações de expressão sofridas por eles tanto em uma hibridização como entre hibridizações de uma ou mais amostras biológicas. Esses resultados são representados de forma a facilitar a visualização gráfica, permitindo uma leitura geral dos genes ou grupos de genes mais expressos nos estágios estudados do ciclo de vida do *T. cruzi*. Tal método possibilita identificar os

genes em que a expressão varia de maneira correlacionada, o que pode se refletir em vias comuns de regulação entre esses genes. Também permite mensurar a distância filogenética que há entre os diferentes estágios estudados do *T. cruzi*.

Para realizar os cálculos foi usada a medida de distância euclidiana, que leva em conta a magnitude das diferenças, podendo variar de zero, para amostras totalmente semelhantes, até teoricamente $+\infty$. Uma vez medidas essas distâncias, os resultados foram submetidos ao algoritmo de agrupamento hierárquico (UPGMA, Sokal e Michener, 1958) que resultou em um dendograma onde todos os elementos estão organizados em uma mesma árvore. O *software* usado para calcular a distância euclidiana e fazer o agrupamento foi CLUSTER (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) (Eisen *et al.*, 1998). Os resultados foram mostrados em uma tabela de similaridade contendo todos os genes e todos os estágios do *T. cruzi* em questão, onde um código de cores dá a noção da variação na expressão gênica:

Preto - células com razões logarítmicas iguais a zero;

Vermelho com intensidade crescente - razões logarítmicas crescentemente positivas;

Verde com intensidade crescente - razões logarítmicas crescentemente negativas.

A ordenação das células foi criada pelo método de agrupamento hierárquico e o processo de visualização pelo *software TreeView*, disponível em <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

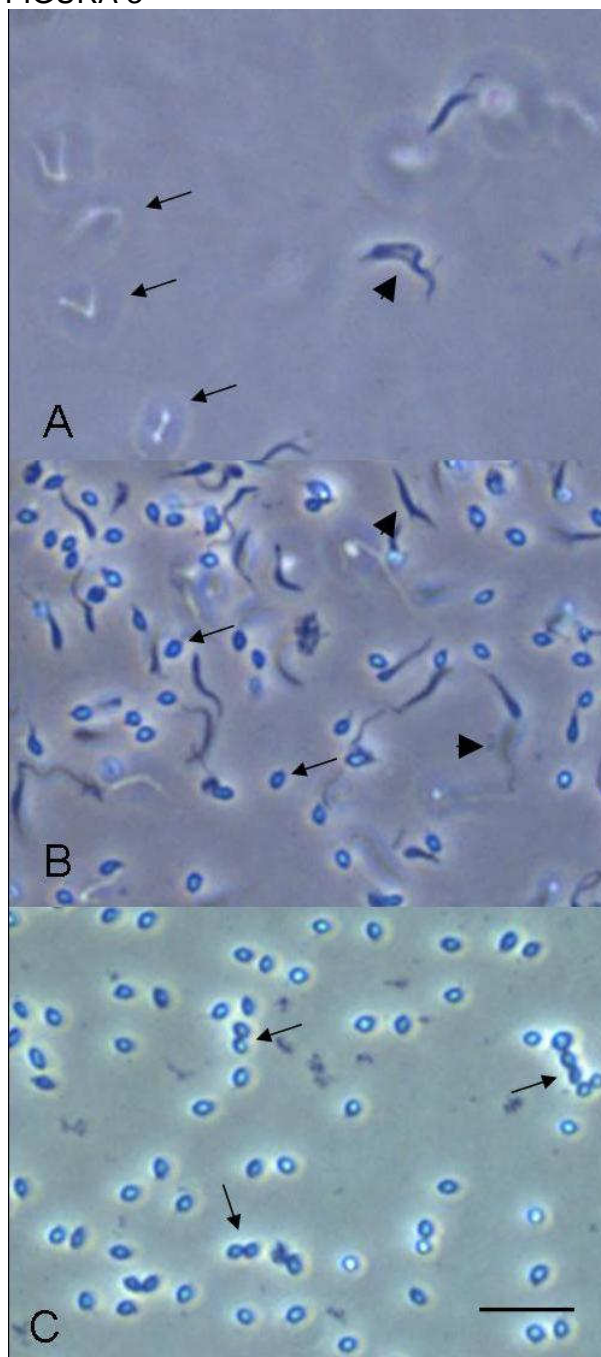
4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DOS AMASTIGOTAS

O desenvolvimento de um sistema capaz de propiciar a obtenção de formas amastigotas provenientes de tripomastigotas metacíclicos (Contreras *et al.*, 2002) representou parte fundamental deste estudo, pois através dele foi possível conseguir quantidade suficiente de células deste estágio para realizar os experimentos, além de permitir o início da observação de eventos marcantes da diferenciação. O entendimento do ciclo de vida do *T. cruzi*, com especial atenção à metaciclogênese, tem sido o alvo de interesse deste grupo de pesquisa nos últimos 25 anos. O presente estudo vem de encontro aos objetivos do grupo, pois contribui com novos conhecimentos sobre o ciclo evolutivo do parasita, além de abrir novas oportunidades para o estudo dos amastigotas.

As formas amastigotas extracelulares foram obtidas partindo-se de tripomastigotas metacíclicos provenientes de meio definido. A figura 3 ilustra as fases deste processo por microscopia de contraste de fase. Em A observam-se os tripomastigotas metacíclicos recém inoculados no meio de diferenciação MEMTAU. Nem todos os parasitas encontram-se no mesmo plano de foco, pois movimentavam-se ativamente pelo meio, indicando bom estado fisiológico. A célula em foco apresenta morfologia condizente com o que se espera, demonstrando se tratar de tripomastigotas metacíclicos. Em B, a cultura com 36 h já conta com aproximadamente 50% de células cuja morfologia se assemelha às formas amastigotas. Tripomastigotas metacíclicos também são vistos em diferentes planos de foco. Em C, após 72 h de cultivo a maioria dos tripomastigotas metacíclicos já se diferenciou em amastigotas, alguns inclusive sugerindo que tinham terminado um ciclo de divisão. Nesse estágio, retira-se delicadamente o sobrenadante da cultura para não perturbar as células sedimentadas, a fim de enriquecê-la em aproximadamente 95% com amastigotas. A cultura é expandida por mais dois dias e o número de células é praticamente dobrado.

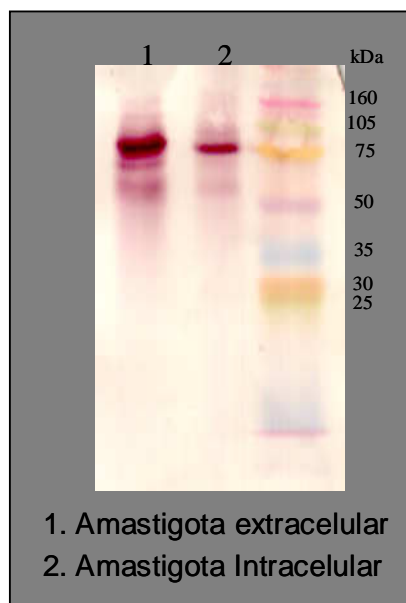
FIGURA 3



Diferenciação de tripomastigota metacíclico para amastigota extracelular analisada por microscopia de contraste de fase. A) No Início da diferenciação, observam-se tripomastigotas movimentando-se livremente pelo meio, indicado pelos parasitas fora de foco (seta) e em foco (cabeça de seta). B) Com 36 horas de diferenciação, por volta de 50% das células apresentam morfologia característica de amastigotas (seta) enquanto que tripomastigotas metacíclicos são vistos em diferentes planos de foco (cabeça de seta). C) Após 72 horas e delicada lavagem, a cultura fica enriquecida com 95% de formas amastigotas. A imagem sugere que alguns tenham terminado um ciclo de divisão celular (seta). Barra = 10 μ m.

Para confirmar que as células obtidas se tratavam de amastigotas, foi feito *Western blot* usando o anticorpo monoclonal α -Ssp4, específico para amastigotas (Fig. 4). A reação foi positiva e como controle positivo usou-se amastigotas obtidos de cultura de células.

FIGURA 4



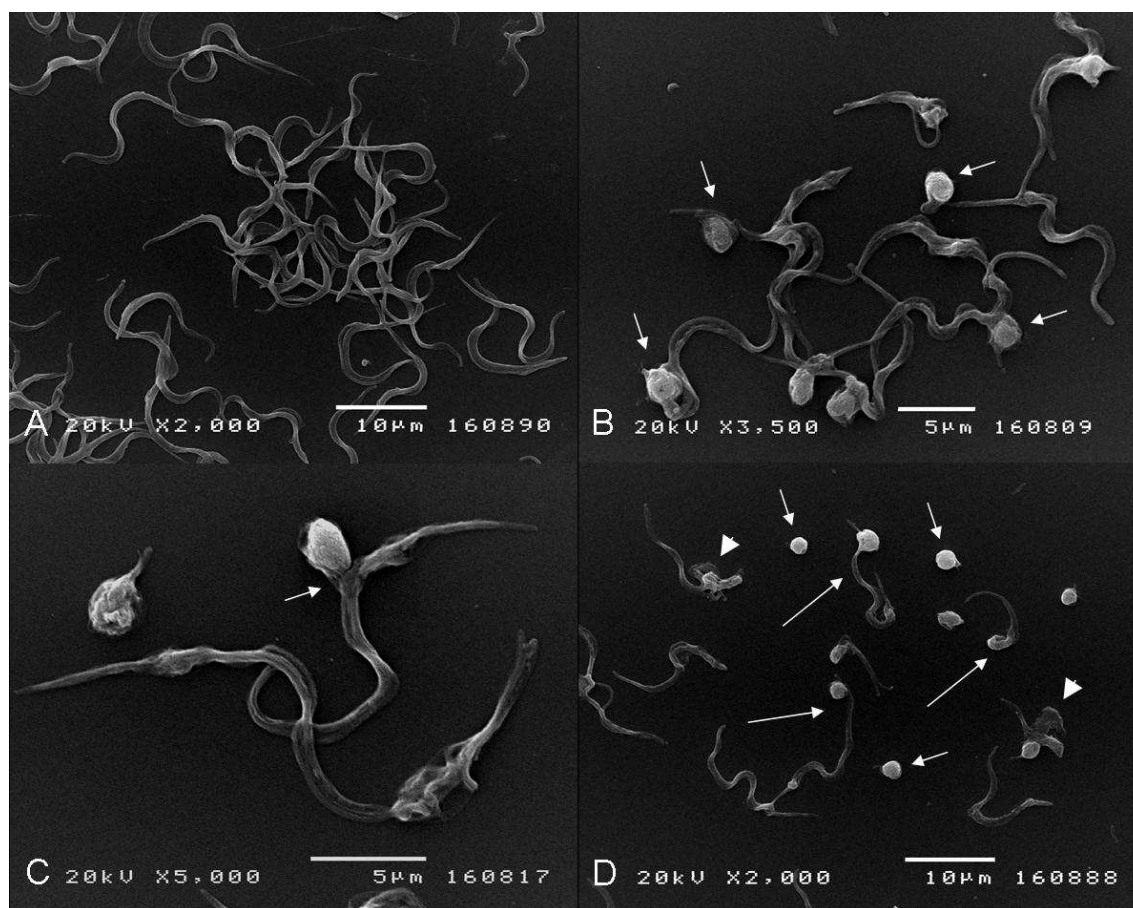
Deteção do antígeno Ssp4, marcador específico de amastigota, por *Western blot*. Nota-se que amastigotas extracelulares expressam tal antígeno.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para melhor entender as mudanças morfológicas observadas desde o início do processo de diferenciação, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A microscopia eletrônica de varredura permitiu observar detalhes relevantes do processo de diferenciação. A figura 5A mostra a população de tripomastigotas metacíclicos bem no início da diferenciação. Todas as células possuem a morfologia esperada. Conforme a diferenciação avança por 24 h, começam a surgir projeções arredondadas em uma das extremidades dos tripomastigotas metacíclicos, que crescem como em um brotamento e assemelham-se às formas amastigotas (Fig. 5B). Após crescer e se tornar evidente, o amastigota

inicia um processo de separação do tripomastigota metacíclico que lhe deu origem, por meio de uma constrição da membrana plasmática no ponto de contato entre as duas células (Fig. 5C). Com 48 h já é possível notar amastigotas livres, restos celulares de tripomastigotas e células em diferenciação (Fig. 5D).

FIGURA 5

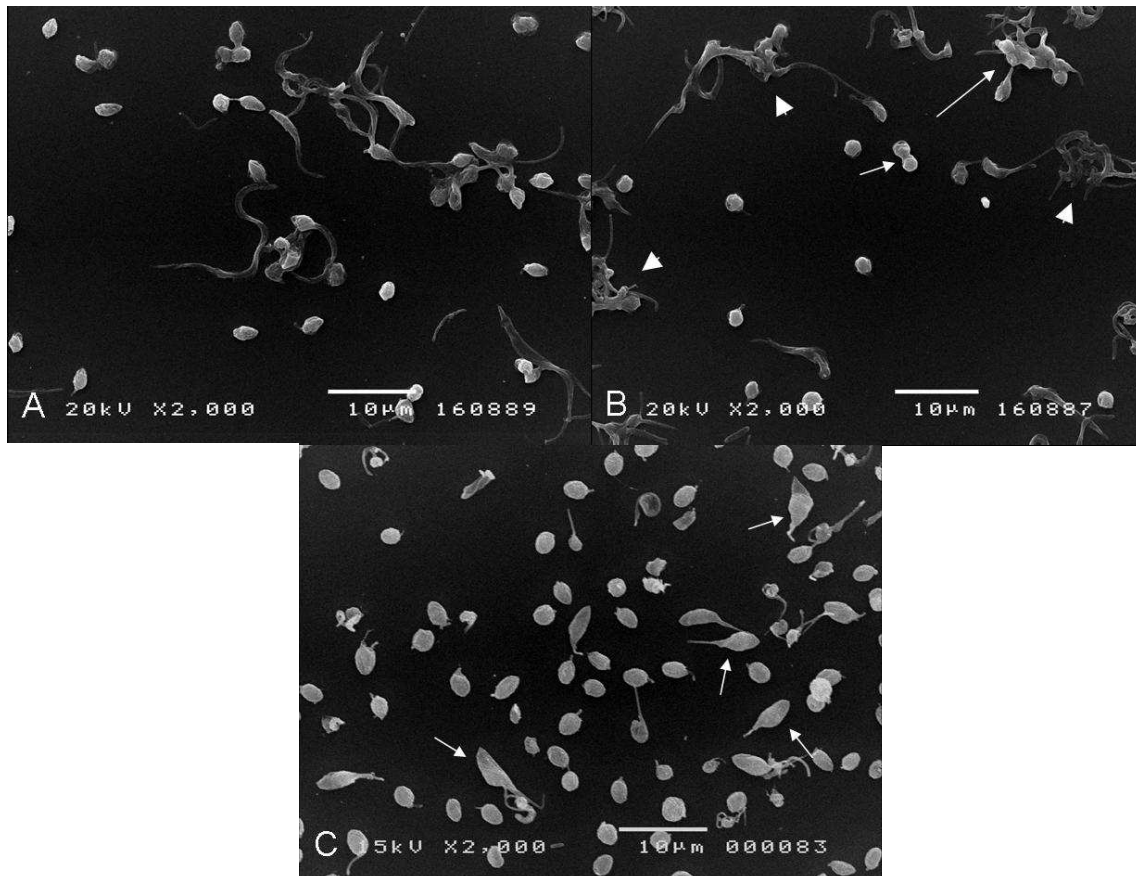


Diferenciação de tripomastigota metacíclico para amastigota extracelular analisada por microscopia eletrônica de varredura. A) Metacíclicos no início da diferenciação. B) Com 24 h notam-se projeções na extremidade dos metacíclicos que se assemelham à forma amastigota (seta). C) Os amastigotas são liberados após uma constrição da membrana plasmática na região de contato entre as estruturas (seta). D) Após 48 horas é possível visualizar amastigotas livres (seta), restos celulares de metacíclicos (cabeça de seta) e células em diferenciação (seta longa).

Com 72 h a maioria das células já se encontra diferenciada (Fig. 6A). Observa-se também amastigotas em divisão e restos celulares de tripomastigotas metacíclicos que aparentemente tendem a formar agregados. Alguns desses parecem ser formados por células em diferenciação, já que amastigotas parecem

emergir deles (Fig. 6B). Por fim, se a cultura for expandida e mantida por mais de 48 h, os amastigotas começam a diferenciar-se em epimastigotas (Fig. 6C).

FIGURA 6



Diferenciação de tripomastigota metacíclico para amastigota extracelular analisada por microscopia eletrônica de varredura. A) Após 72h a maioria das células já está diferenciada em amastigota. B) Nota-se um amastigota em adiantado processo de divisão (seta), restos de metacíclicos formando agregados (cabeça de seta) e amastigotas emergindo de um dos agregados (seta longa). C) Após 48 h de expansão da cultura, já é possível notar formas que se assemelham a epimastigotas (seta), provavelmente originadas a partir dos amastigotas.

Com o uso de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, tem-se um maior nível de detalhes do processo. Nas figuras 7A e 7B observa-se o início de um brotamento na forma tripomastigota metacíclica. Num estágio mais avançado nota-se o crescimento e desenvolvimento do broto, além de detalhes de sua superfície repleta de rugosidades (Fig. 7C e 7D).

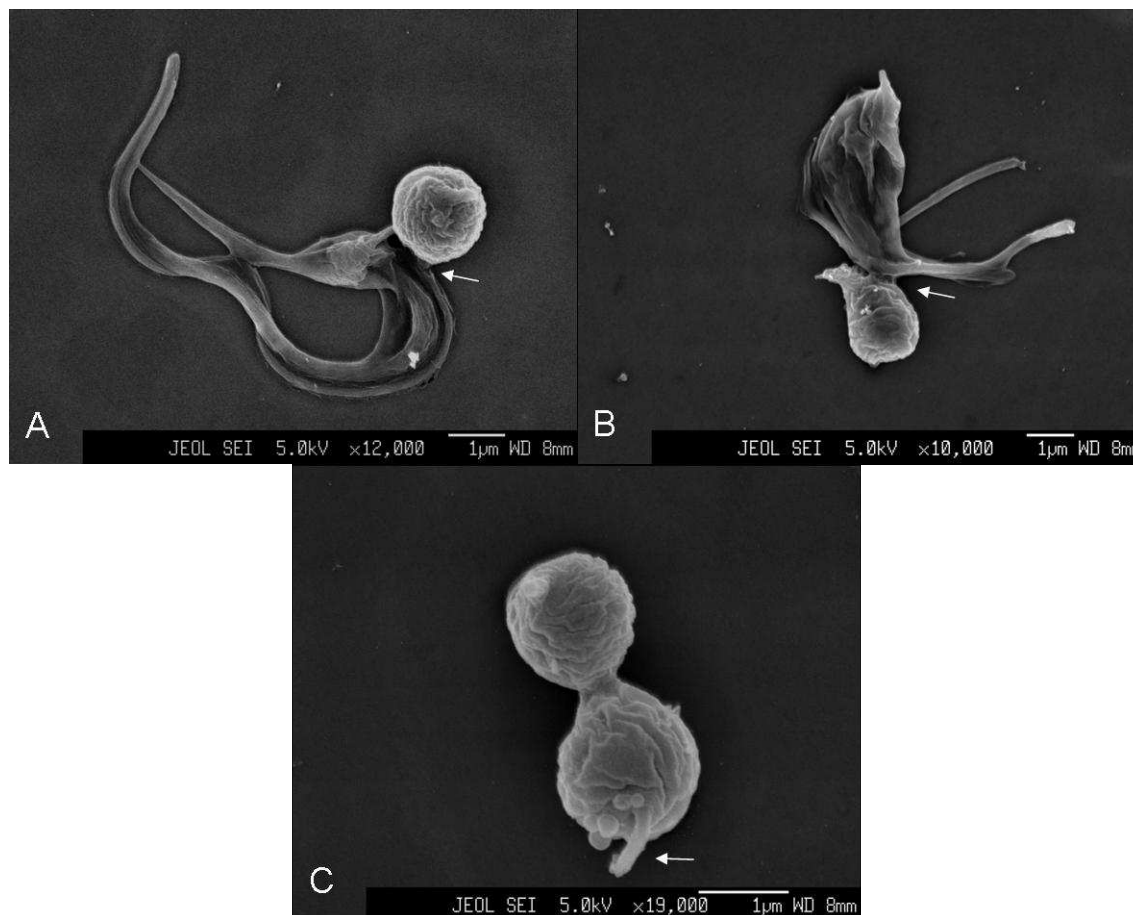
FIGURA 7



Diferenciação de tripomastigota metacíclico para amastigota extracelular analisada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução. A e B) Início da diferenciação evidenciado pela formação de um broto na extremidade do parasita (seta). C e D) Com o avançar do processo o broto se desenvolve e assume uma morfologia cada vez mais semelhante a de um amastigota. É possível notar detalhes como as rugosidades da superfície.

As figuras 8A e 8B parecem revelar os momentos anteriores à liberação das formas amastigotas. Já a figura 8C mostra claramente o final da divisão de um amastigota, com destaque para o curto flagelo emergindo da bolsa flagelar de um deles.

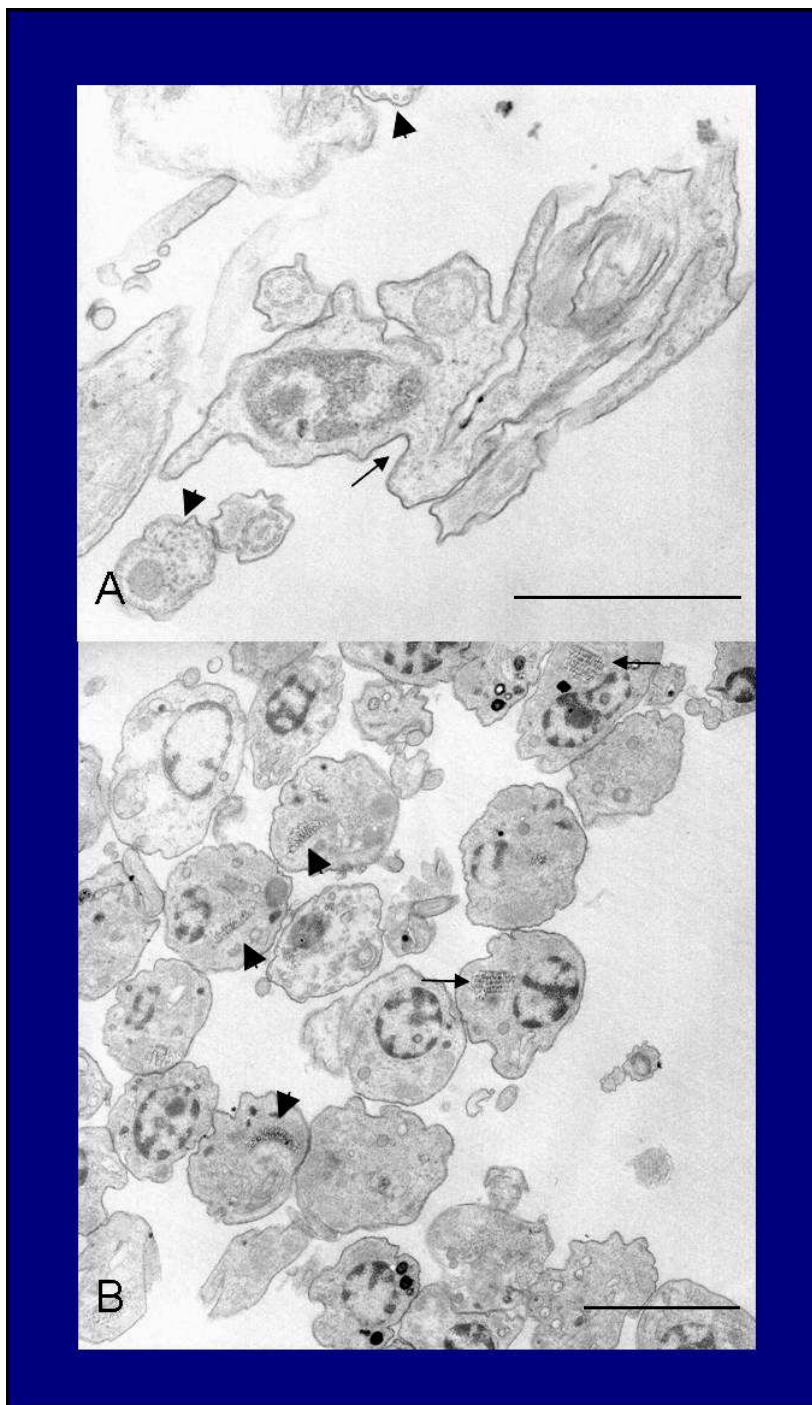
FIGURA 8



Diferenciação de tripomastigota metacíclico para amastigota extracelular analisada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução. A e B) Num estágio avançado da diferenciação, os amastigotas estão prontos para serem liberados pelo estrangulamento do ponto que ainda une as estruturas (seta). C) Um amastigota em divisão. Nota-se o curto flagelo de um deles na região da bolsa flagelar (seta).

A microscopia eletrônica de transmissão revelou detalhes ultra-estruturais do processo nas formas pleiomórficas. Na figura 9A é possível observar em alguns restos celulares o citoplasma elétron-lúcido ausente em organelas, mas contendo microtúbulos sub-peliculares adjacentes à membrana plasmática. Um possível ponto de constrição e liberação de amastigota é visualizado. Após 72 h, a maioria das células possui a forma de amastigotas, mas no âmbito ultra-estrutural, a diferenciação ainda está para se completar. Algumas células possuem o cinetoplasto em forma de cesto, que é característico de tripomastigotas metacíclicos. Em outras, a mesma estrutura tem formato de barra, característico de amastigotas (Fig. 9B).

FIGURA 9



Diferenciação de tripomastigota metacíclico para amastigota extracelular analisada por microscopia eletrônica de transmissão. A) Células em avançado estágio de diferenciação com citoplasma elétron lúcido apresentando microtúbulos sub-peliculares (cabeça de seta). Possível ponto de estrangulamento para liberação de amastigota (seta). B) Com 72h, nota-se em alguns amastigotas cinetoplasto em forma de cesto, característico de metacíclicos (seta). Outros já completaram a diferenciação e exibem cinetoplasto em forma de barra, característico de amastigota (cabeça de seta). Barras = 2 μ m.

4.3 CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA DO *T. cruzi*

Devido a grande alteração morfológica observada, especialmente na membrana plasmática, sugeriu-se que tal fenótipo pudesse ser consequência de alterações em sua composição lipídica. Tais alterações, por sua vez, poderiam estar envolvidas com o processo de diferenciação. Assim, esforços foram postos na caracterização dos lipídios totais e de membrana plasmática do *T. cruzi*.

Os ensaios feitos com as amostras de lipídios totais dos diferentes estágios do *T. cruzi* originaram espectros contendo os componentes lipídicos, representados individualmente pela razão entre massa e carga elétrica (m/z) (eixo x do gráfico) e a abundância relativa aos demais lipídios (eixo y). Como há lipídios que ao serem ionizados apresentam cargas negativas ou positivas, cada espectro de cada estágio de *T. cruzi* foi coletado em modo negativo e positivo para um apanhado mais completo dos lipídios que presentes no parasita. A figura 10 mostra o espectro total dos lipídios dos cinco estágios estudados em modo negativo, enquanto que a figura 11 mostra o mesmo em modo positivo.

FIGURA 10

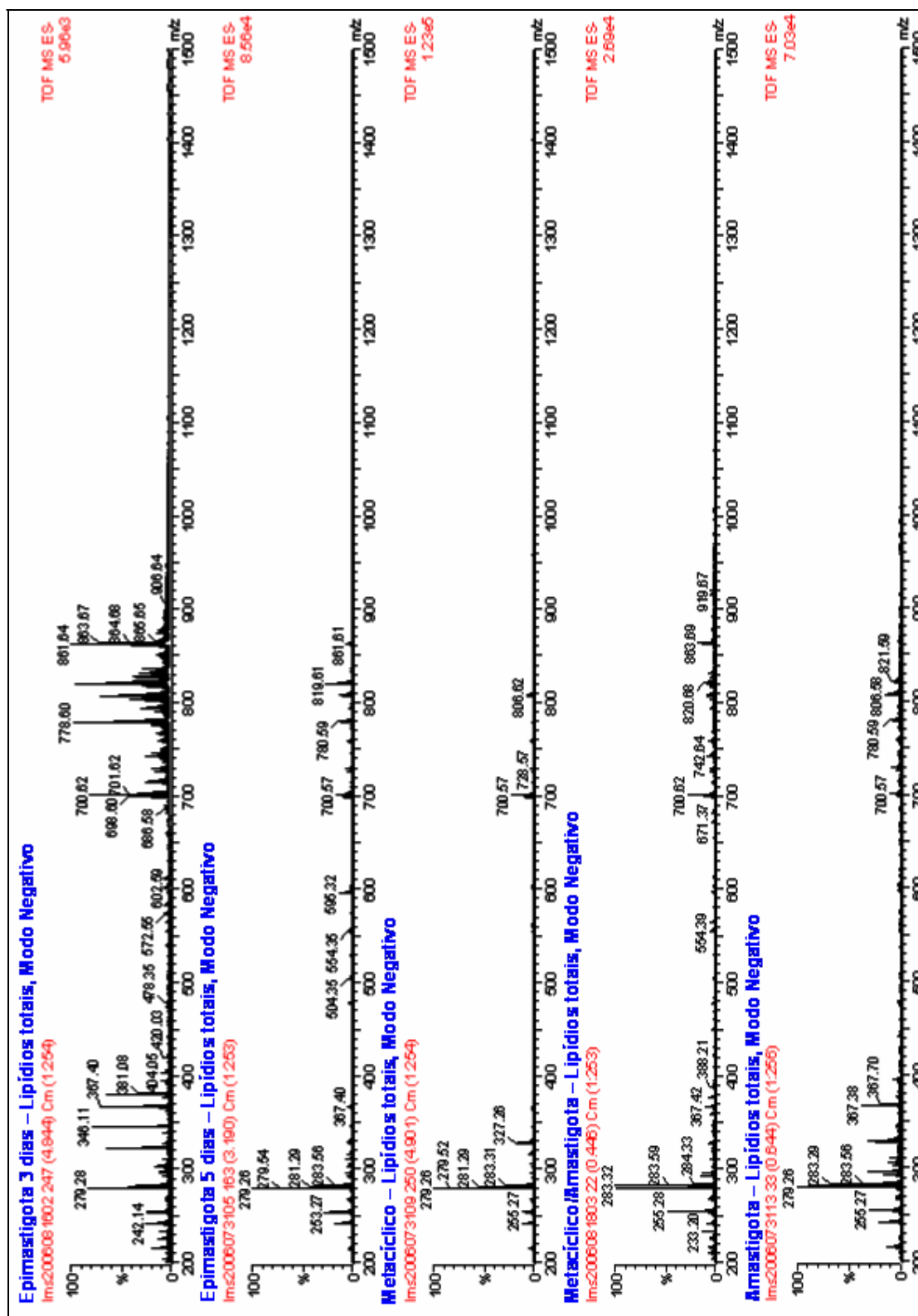
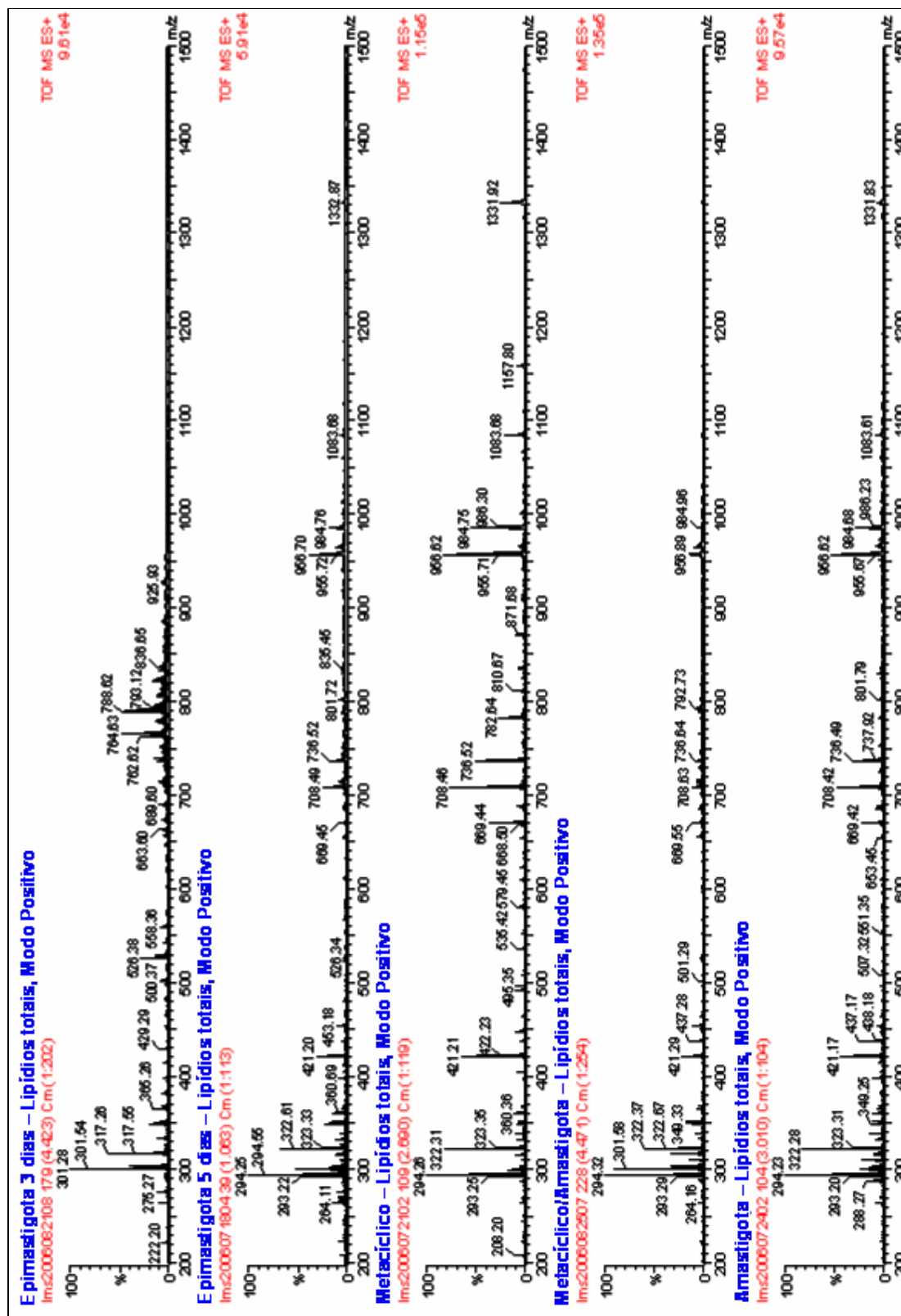
Espectro de lipídios totais em modo negativo de diferentes estágios evolutivos do *T. cruzi*.

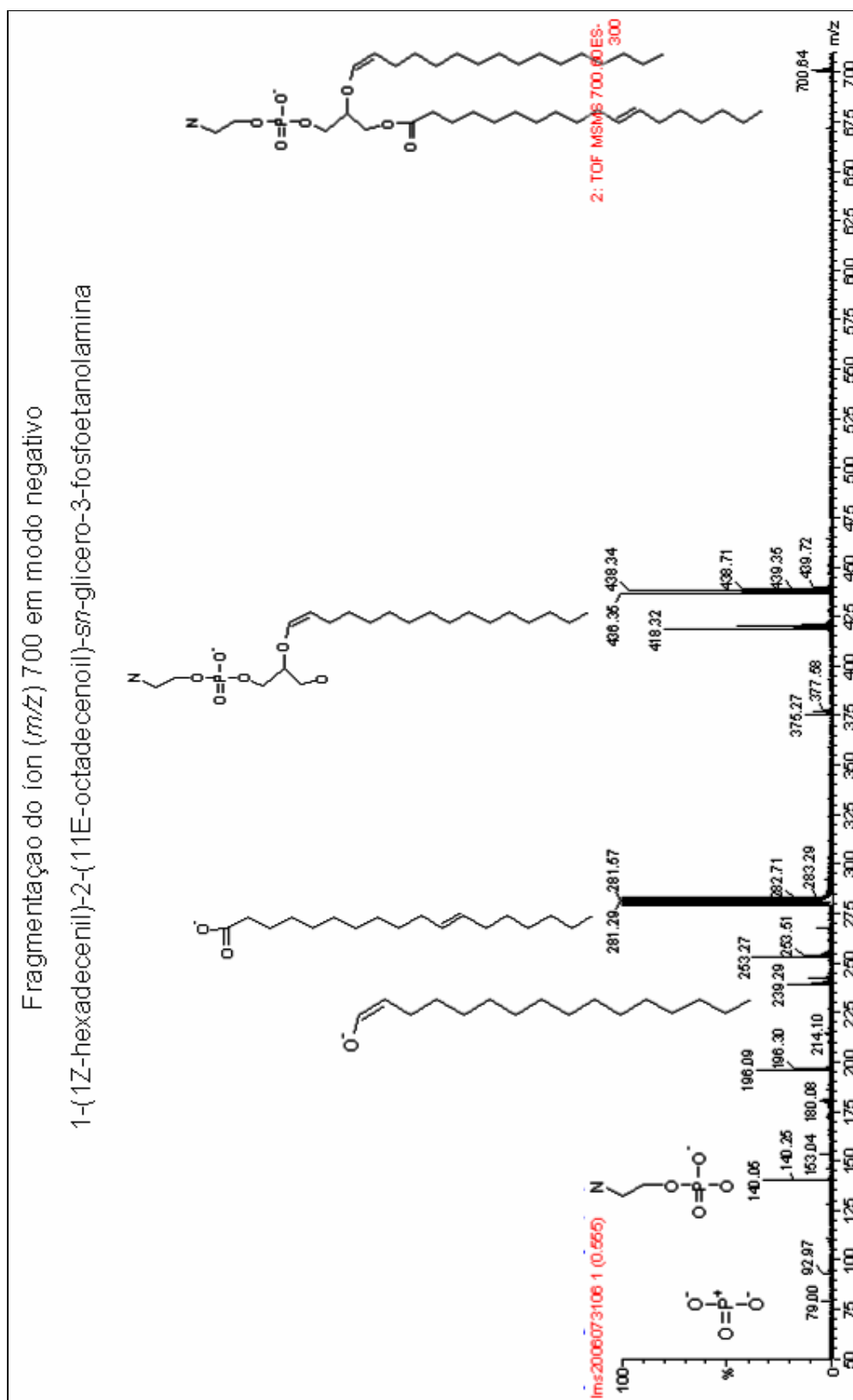
FIGURA 11



Espectro de lipídios totais em modo positivo de diferentes estágios evolutivos do *T. cruzi*.

Através de uma análise rápida, é possível selecionar os lipídios mais abundantes para então descobrir a qual lipídio cada pico se refere. Para tal, é necessário fragmentar cada pico de interesse no espectrômetro de massas e coletar o espectro de fragmentação. Com conhecimento de como diferentes lipídios se fragmentam sob diferentes condições, estabelecem-se íons que são diagnósticos para o lipídio em questão. Um exemplo desta análise é dado no espectro de fragmentação do íon m/z 700, na figura 12.

FIGURA 12

Espectro de fragmentação do íon m/z 700.

Nos Anexos I e II encontram-se nome oficial, abreviação e estrutura das espécies lipídicas identificadas em modo positivo e negativo. Quando as espécies se diferem pelo valor de m/z em 2 unidades, como no caso do m/z 279, 281 e 283 (tabela 1), significa a quebra de uma ligação dupla na cadeia hidrofóbica que tem de ser compensada pela entrada de dois átomos de Hidrogênio e consequentemente mais duas unidades de massa atômica.

Usando essa abordagem os lipídios obtidos em modo negativo, que puderam ser identificados, encontram-se na tabela 1. Analisando os dados, notou-se que em todos os estágios do ciclo de vida a espécie mais abundante é a de ácido graxo de 18 carbonos com até duas insaturações. Amostras de Epi 3 dias também apresentaram dez outras espécies muito abundantes, na ordem: m/z 861, 778, 819, 700, 863, 806, 821, 780, 808, 698. Todos possuíam tamanho similar nas cadeias hidrofóbicas, geralmente uma com 16 e outra com 18 carbonos. O número de ligações duplas entre os átomos de carbono não excedeu a duas. Nas cabeças polares desses fosfolipídios foram encontrados etanolamina, inositol e colina. Nos lipídios obtidos em modo positivo, a maior abundância ficou por conta do ácido graxo de vinte carbonos com uma insaturação (m/z 317). Os demais lipídios que puderam ser identificados são do grupo da glicerofosfatidilcolina com cadeia apolar variando entre 16 e 20 carbonos e abundância superior nos Epi 3 dias.

Ao acompanhar a diferenciação de metacíclico para amastigota, foi possível perceber uma pequena alteração na abundância de liso-glicerofosfolipídios, como mostram os íons m/z 476, 478, 504, 554, 556, 595, 597 (tabela 1). Em geral, nos metacíclicos tal abundância foi menor, se comparados com metacíclicos em diferenciação (Meta-Ama). Para alguns desses íons a abundância voltava a cair ou se estabilizava quando a diferenciação para amastigota se completava. O mesmo efeito foi observado para os íons m/z 819, 821, 861, 863, que foram encontradas em todos os estágios, mas não em metacíclicos. A abundância dos lipídios em modo positivo (tabela 2) também seguiu essa tendência, observada nos íons m/z 317, 526, 764, 788. Todos apresentaram valores maiores durante a diferenciação (Meta-Ama) se comparados às formas metacíclicas e amastigotas.

TABELA 1 – ÍONS SELECIONADOS DOS ESPECTROS OBTIDOS EM MODO NEGATIVO E SUAS RESPECTIVAS QUANTIDADES RELATIVAS^a EM CADA ESTÁGIO EVOLUTIVO DO *T. cruzi*

<i>m/z</i>	Espécie lipídica	Epi 3 dias (%) ^a	Epi 5 dias (%) ^a	Meta (%) ^a	Meta/Ama (%) ^a	Ama (%) ^a
279	C(18:2(9Z,12Z))	82,70	100,00	100,00	98,41	100,00
281	C(18:1(9Z))	43,40	41,81	53,47	27,55	89,93
283	C(18:0)	34,83	37,22	27,45	100,00	66,73
476/478	GPCho(16:1(9Z)/0:0)	0	0	0	3,05 / 1,54	2,15 / 2,65
504	GPCho(18:2(9Z,12Z)/0:0)	2,88	3,66	0	2,19	0
554/556	GPCho(18:2(9Z,12Z)/0:0)	5,05 / 3,43	0	1,30 / 0	5,78 / 3,50	1,76 / 0
595/597	GPIIns(18:1(11E)/0:0)	0	13,42 / 6,14	0	2,51 / 3,05	0 / 2,40
698/700	GPEtn(16:0p/18:2(9Z,12Z))	42,61 / 81,56	9,52 / 16,27	10,25 / 22,45	12,14 / 27,59	4,30 / 9,82
726/728	GPEtn(18:0p/18:2(9Z,12Z))	0	5,02 / 6,40	1,77 / 3,78	5,90 / 5,91	4,87 / 8,84
743	GPEtnMe(18:0e/18:2(9Z,12Z))	13,08	0	0	4,45	1,57
756/758	GPCho(18:0e/18:2(9Z,12Z))	13,27	3,82/5,60	1,89/3,76	3,16/6,67	3,41/4,59
778/780	InsPCer(d18:1/16:0)	98,25 / 57,48	12,27 / 12,84	1,66 / 1,13	2,66 / 2,46	7,57 / 9,03
792	GPCho(16:1(9Z)/18:1(11E))	29,55	2,98	0	2,85	2,29
806/808	InsPCer(d18:1/18:0)	71,26 / 51,00	10,42 / 12,61	7,39 / 6,63	8,70 / 9,01	15,67 / 11,78
819/821	GPIIns(16:0e/18:2(9Z,12Z))	94,50 / 65,70	26,69 / 11,60	0	7,76 / 6,48	5,93 / 7,70
861/863	GPIIns(18:2(9Z,12Z)/18:0)	100,00 / 71,70	7,03 / 4,16	0	13,84 / 17,29	1,18 / 2,77

a) As porcentagens foram normalizadas usando o pico mais abundante de cada estágio como 100%.

TABELA 2 – ÍONS SELECIONADOS DOS ESPECTROS OBTIDOS EM MODO POSITIVO E SUAS RESPECTIVAS QUANTIDADES RELATIVAS^a EM CADA ESTÁGIO EVOLUTIVO DO *T. cruzi*

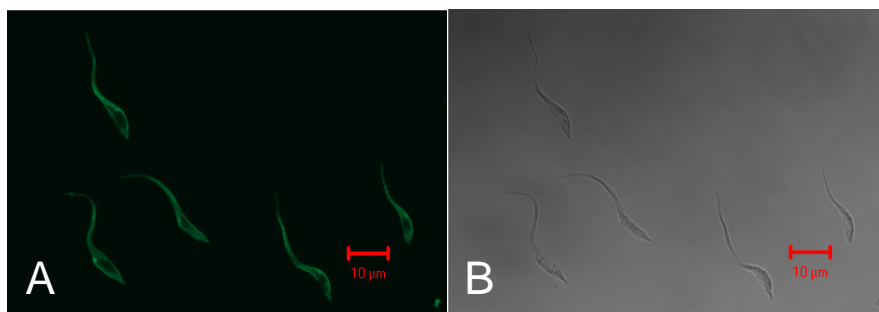
<i>m/z</i>	Espécie lipídica	Epi 3 dias (%) ^a	Epi 5 dias (%) ^a	Meta (%) ^a	Meta/Ama (%) ^a	Ama (%) ^a
317	C(20:1(9Z))	60,93	10,61	3,27	32,05	10,36
500	GPCho(16:1(9Z)/0:0)	8,37	1,94	0	0	0
526	GPCho(18:2(9Z,12Z)/0:0)	28,15	3,64	0	4,42	0
558	GPCho(20:0/0:0)	8,96	0	0	0	0
764	GPCho(16:0/18:2(9Z,12Z))	47,35	3,70	1,38	5,67	2,02
788	GPCho(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z))	46,20	4,77	2,18	6,38	2,04

a) As porcentagens foram normalizadas usando o pico mais abundante de cada estágio como 100%.

4.4 CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DO *T. cruzi*

A capacidade de ligação específica da molécula de biotina às proteínas de superfície do *T. cruzi* foi verificada usando microscopia confocal. A figura 13 mostra de forma geral o resultado desta marcação em epimastigotas cultivados por três dias. As proteínas de superfície foram coradas com estreptavidina conjugada com o fluoróforo Alexa 488 (Fig. 13A). Os parasitas foram observados usando contraste interferencial diferencial (Fig. 13B).

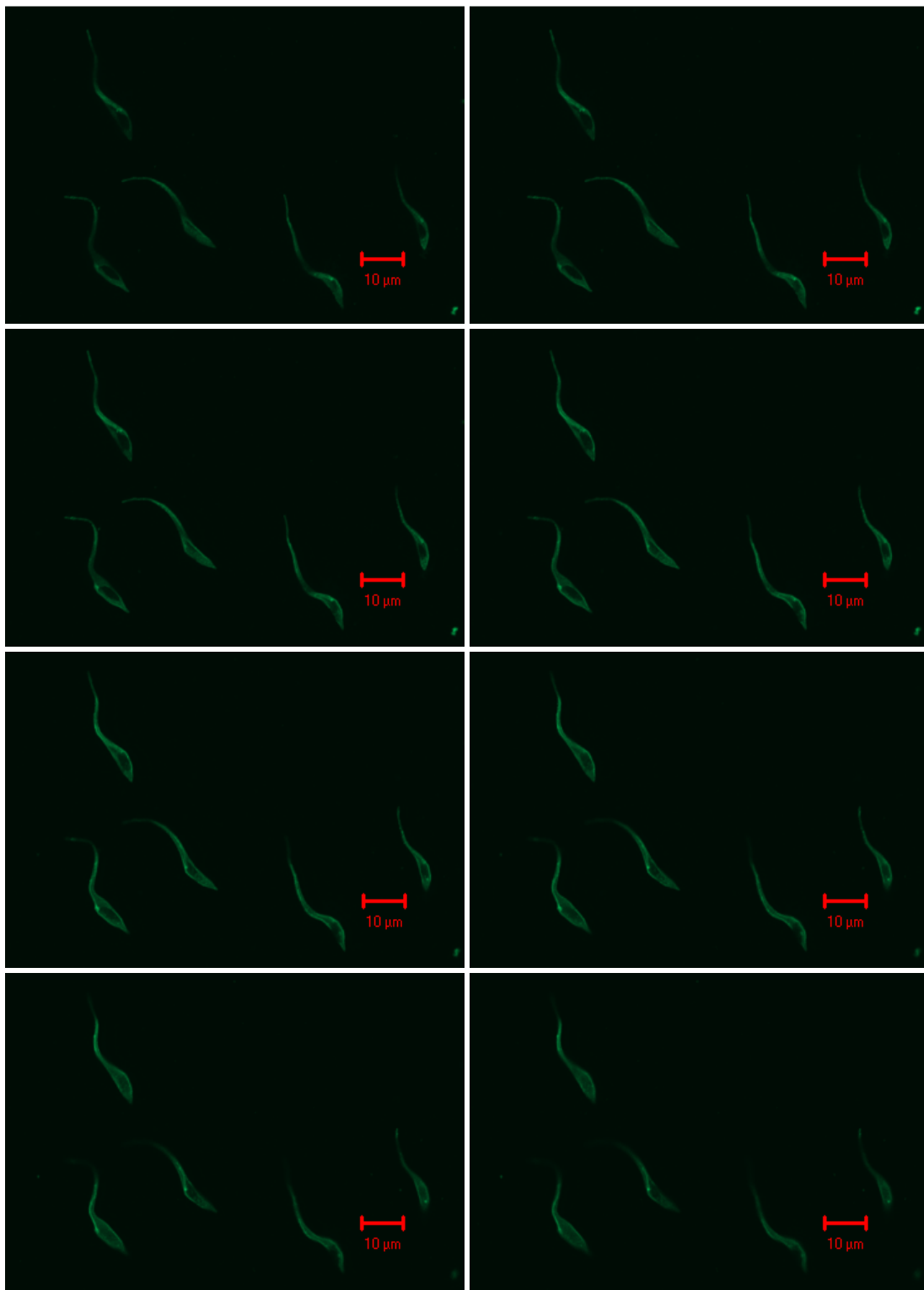
FIGURA 13



Visão geral da marcação com biotina de proteínas da superfície de epimastigotas, analisadas por microscopia confocal a laser. A) Marcação com biotina conjugada com Alexa 488; B) Contraste Interferencial.

A figura 14 mostra a série de imagens de cortes óticos de epimastigotas feitos no microscópio confocal a laser. Cada corte com 0,3 μm de espessura, do topo para a base das células. Através dos cortes observa-se que a marcação com biotina ficou restrita à superfície da célula e que as chances dela ocorrer no interior com a biotina endógena são bem pequenas seguindo o protocolo utilizado. Marcação semelhante foi vista para os estágios metacíclico e amastigota extracelular, porém, tais imagens não foram aqui exibidas.

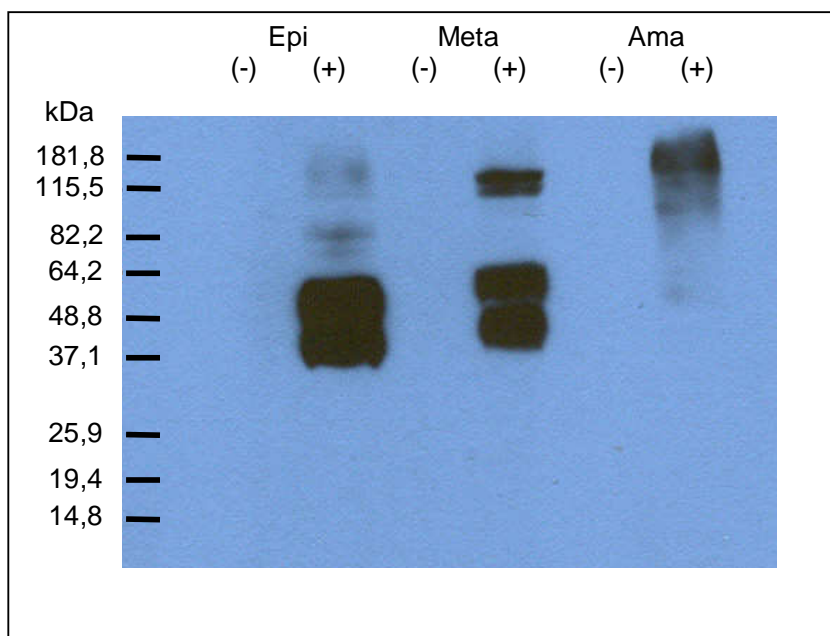
FIGURA 14



Seqüência de cortes ópticos obtidos por microscopia confocal a laser, mostrando a marcação apenas das proteínas de superfície pela biotina. Os cortes estão ordenados do topo para a base da célula e cada um mede 0,3 μm de espessura.

Para confirmar esta idéia usando uma técnica mais sensível, foi feito um *Western blot* (Fig. 15) com extrato de epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos e amastigotas, previamente incubados ou não incubados com biotina. O ensaio revelou que em células não incubadas com biotina nenhuma marcação foi detectada, nem mesmo de uma possível biotina endógena. Já nas células incubadas, a marcação foi condizente com o esperado, revelando glicoproteínas de superfície como gp35/50 e gp82, além de outros complexos de maior massa molecular.

FIGURA 15



Detecção da marcação com biotina dos estágios epimastigota (Epi), tripomastigota metacíclico (Meta) e amastigota (Ama), com o uso de estreptavidina conjugada com peroxidase. Nota-se que apesar da sensibilidade da técnica, a biotina endógena não foi detectada, sugerindo marcação específica da superfície. As proteínas marcadas possuem massa condizente com abundantes glicoproteínas da superfície do *T. cruzi* como gp35/50 e gp82, além de outros complexos de maior massa molecular. (-) Não marcado com biotina; (+) marcado com biotina.

Com essas informações, o protocolo de enriquecimento com lipídios de superfície foi testado usando epimastigotas. O resultado da extração dos lipídios e análise por ESI/MS em modo negativo dos seguintes íons: m/z 698, 700, 778, 780, 806, 819, 821, 861, 863, todos já identificados na tabela 1. Além destes, foram

observados outros íons sem identificação como m/z 711, 713, 802, 815, 883. Em modo positivo foram encontradas as seguintes espécies: m/z 236, 275, 317, 351, 484, 801, 963, em que apenas o m/z 317 foi identificado (tabela 2). Tais dados apontam a viabilidade desta técnica para se obter amostras enriquecidas com lipídios de membrana plasmática.

4.5 MICROARRANJO DE DNA

Um dos objetivos deste trabalho foi investigar, ainda que de forma geral e preliminar, os genes diferencialmente expressos entre os estágios Metacíclico e Amastigota Extracelular do *T. cruzi*. Além disso, foram feitas comparações entre as formas Amastigota Intracelular e Extracelular, sob a ótica da genômica funcional, contextualizada num grupo de genes selecionados por sofrerem modulação na expressão, quando comparados vários estágios evolutivos.

Os experimentos foram planejados e executados de maneira que cada estágio fosse hibridizado com todos os outros (ex: Amastigota extracelular x Epimastigota; Amastigota extracelular x Metacíclico; Amastigota extracelular x Amastigota intracelular). Tais hibridizações foram fundamentais para aumentar a confiabilidade aos dados tanto por meio de comparações diretas quanto indiretas entre os estágios. A tabela 3 mostra os resultados para genes diferencialmente expressos em Amastigota Extracelular comparado a Metacíclico. Cinquenta e dois genes representados por 74 sondas (pois pode haver mais de uma sonda para o mesmo gene) foram mais expressos em Amastigota Extracelular que em Metacíclico. Segundo os critérios estabelecidos para classificar a expressão (ver materiais e métodos), 7 sondas receberam a classificação “A”, ou seja, foram 3 vezes mais expressos em Amastigota nas duas amostras biológicas; 31 a classificação “B”, foram 3 vezes mais expressos em uma amostra biológica e 2 vezes mais expressos na outra; e 36 a classificação “C”, foram 2 vezes mais expressos nas duas amostras biológicas. Dezesete proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas (pois foram encontrados homólogos em organismos correlatos, principalmente *T. brucei* e *L. major*) foram consideradas mais expressas em Amastigota Extracelular

Em contrapartida, houve 22 genes representados por 27 sondas menos expressos em Amastigotas que em Metacíclicos, sendo que: 2 sondas receberam a classificação “-A”; 16 sondas a classificação “-B”; e 9 sondas a classificação “-C”. Além disso, 18 sondas foram consideradas discrepantes, ou seja, em uma amostra estava mais expresso em Amastigota, e na outra em Metacíclicos, ou vice-versa.

TABELA 3 – GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS EM AMASTIGOTA EXTRACELULAR QUANDO COMPARADOS COM METACÍCLICO

continua

Sonda	Classificação	Gene	Descrição
IB_MT_05_B07	X	4918.t00002	hypothetical protein, conserved
MG_ST_09_C03	X	6207.t00017	hypothetical protein, conserved
TcBc5.01182	X	6411.t00009	hypothetical protein, conserved
TcBc5.01765	X	6876.t00004	hypothetical protein, conserved
CTG_1266	X	7027.t00024	hypothetical protein, conserved
TcBc5.02247	X	7116.t00003	hypothetical protein, conserved
MG_24H_04_E10	X	7118.t00016	hypothetical protein, conserved
IB_ST_02_H06	X	7617.t00015	hypothetical protein, conserved
MG_24H_17_A08	X	7730.t00001	NUP-1 protein, putative
MG_ST_14_G07	X	7813.t00004	nucleoside transporter 1, putative
CTG_3500	X	7878.t00002	hypothetical protein, conserved
CTG_1653	X	8035.t00004	glycosomal membrane protein, putative
MG_ST_10_H06	X	8035.t00004	glycosomal membrane protein, putative
MG_ST_05_H05	X	8044.t00005	hypothetical protein, conserved
MG_EP_09_C01	X	8414.t00002	3-ketoacyl-CoA thiolase, putative
MG_EP_02_D07	X	8646.t00010	hypothetical protein, conserved
MG_24H_20_E10	X	8646.t00010	hypothetical protein, conserved
TcBc5.00005	X	8745.t00001	hypothetical protein, conserved
CTG_882	C	11788.t00001	alpha tubulin, putative
CTG_602	B	3262.t00001	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase, putative
MG_24H_16_C12	A	4737.t00003	hypothetical protein, conserved
MG_24H_07_E10	B	4935.t00007	hypothetical protein, conserved
IB_ST_01_A04	C	4935.t00007	hypothetical protein, conserved
CTG_2236	A	5346.t00004	hypothetical protein, conserved
TcBc5.00865	C	5522.t00010	hypothetical protein
MG_EP_10_B08a	B	5666.t00001	fatty acid desaturase, putative
IB_MT_04_D03	C	5785.t00004	kinetoplast DNA-associated protein, putative
CTG_253	B	5923.t00004	cytosolic malate dehydrogenase, putative
MG_EP_02_B07	B	5923.t00004	cytosolic malate dehydrogenase, putative
MG_24H_14_D10	B	5923.t00004	cytosolic malate dehydrogenase, putative
CTG_620	C	6090.t00019	prostaglandin F synthase, putative

TABELA 3 – GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS EM AMASTIGOTA EXTRACELULAR QUANDO COMPARADOS COM METACÍCLICO

continuação

Sonda	Classificação	Gene	Descrição
MG_24H_18_A12	C	6207.t00017	hypothetical protein, conserved
CTG_496	B	6680.t00001	sterol 24-c-methyltransferase, putative
IB_ST_20_H11	B	6680.t00001	sterol 24-c-methyltransferase, putative
MG_ST_14_G01	B	6680.t00001	sterol 24-c-methyltransferase, putative
MG_EP_04_H10	C	6680.t00001	sterol 24-c-methyltransferase, putative
CTG_1027	C	6793.t00001	amino acid transporter, putative
CTG_1667	C	6829.t00019	hypothetical protein, conserved
MG_24H_10_F02	B	6912.t00005	alcohol dehydrogenase, putative
IB_EP_16_D07	B	6912.t00005	alcohol dehydrogenase, putative
CTG_586	B	6998.t00004	beta tubulin, putative
MG_ST_06_G01b	B	6998.t00004	beta tubulin, putative
MG_24H_13_B01	B	7018.t00017	AF208537 Trypanosoma cruzi retrotransposon L1Tcg62
MG_ST_16_D07	B	7069.t00002	hypothetical protein, conserved
CTG_557	C	7078.t00016	protein kinase, putative
MG_24H_12_G08	B	7175.t00012	ubiquitin hydrolase, putative
CTG_566	C	7180.t00003	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative
CTG_148	C	7191.t00006	orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase, ptv
TcBc5.03998	C	7417.t00008	nucleolar RNA-binding protein, putative
CTG_2426	C	7442.t00020	hypothetical protein, conserved
CTG_3029	C	7667.t00032	AAX70872.1 hypothetical protein, conserved [Trypanosoma brucei]
CTG_4082	C	7667.t00037	mitochondrial DNA topoisomerase II, putative
CTG_1987	C	7678.t00018	hypothetical protein, conserved
CTG_1371	C	7739.t00008	Prostaglandin F2alpha synthase
CTG_3494	C	7739.t00008	Prostaglandin F2alpha synthase
MG_24H_18_A03	C	7739.t00008	Prostaglandin F2alpha synthase
MG_24H_18_B09	C	7916.t00005	hypothetical protein
CTG_1403	B	7960.t00009	hypothetical protein, conserved
CTG_1610	B	8001.t00007	thiol-dependent reductase 1, putative
CTG_1204	B	8038.t00012	peptidase M20/M25/M40, putative
CTG_4212	C	8069.t00006	RNA-binding protein, putative
CTG_97	C	8110.t00007	Histone H3, putative

TABELA 3 – GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS EM AMASTIGOTA EXTRACELULAR QUANDO COMPARADOS COM METACÍCLICO

continuação

Sonda	Classificação	Gene	Descrição
MG_ST_15_G08	B	8134.t00010	nucleoside phosphorylase, putative
CTG_2950	C	8263.t00015	nitrilase, putative
CTG_1590	B	8263.t00050	zinc carboxypeptidase, putative
MG_24H_07_E02	B	8369.t00003	hypothetical protein, conserved
IB_MT_05_E10	C	8455.t00011	ribonuclease, putative
CTG_3251	A	8493.t00002	vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1, putative
CTG_1383	C	8493.t00002	vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1, putative
TcBc5.00429	B	8530.t00019	hypothetical protein, conserved
MG_24H_13_E11	C	8610.t00011	hypothetical protein, conserved
CTG_1110	B	8610.t00012	pantothenate kinase subunit, putative
CTG_2713	B	8694.t00004	hypothetical protein
MG_ST_16_A01	B	8694.t00004	hypothetical protein
MG_24H_16_D12	B	8694.t00004	hypothetical protein
MG_ST_06_E06a	C	8737.t00027	hypothetical protein, conserved
MG_EP_06_G01	C	8754.t00002	cystathionine beta-synthase
CTG_1491	A	8799.t00010	cysteine peptidase C (CPC), putative
CTG_3976	C	8799.t00010	cysteine peptidase C (CPC), putative
CTG_4443	B	8810.t00017	NADH-cytochrome B5 reductase, putative
CTG_518	A	NA	gp63
CTG_1190	C	NA	rRNA
MG_EP_06_C03	C	NA	rRNA
MG_ST_08_B12	C	NA	rRNA
CTG_159	A	NA	rRNA
MG_ST_09_D11	A	NA	rRNA
IB_EP_16_F12	B	NA	rRNA
IB_EP_16_D11	B	NA	rRNA
IB_EP_16_E02	C	NA	rRNA
IB_EP_16_E09	C	NA	rRNA
CTG_3990	B	NA	Unknown
CTG_1759	C	NA	Unknown
MG_24H_16_A03	-B	4770.t00004	glycosyl hydrolase-like protein, putative

TABELA 3 – GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS EM AMASTIGOTA EXTRACELULAR QUANDO COMPARADOS COM METACÍCLICO

Sonda	Classificação	Gene	Descrição	conclusão
CTG_1617	-C	4913.t00016	electron transfer flavoprotein, putative	
CTG_1286	-B	5353.t00009	hypothetical protein, conserved	
MG_ST_15_E12	-B	5408.t00002	hypothetical protein, conserved	
CTG_1923	-B	5595.t00007	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/rotamase, putative	
MG_24H_16_B12	-B	5595.t00007	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/rotamase, putative	
MG_24H_03_F08	-A	6705.t00002	hypothetical protein, conserved	
IB_MT_19_B08	-B	7024.t00010	ras-related protein Rab21, putative	
CTG_2912	-A	7031.t00008	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, putative	
IB_MT_14_F09	-C	7031.t00008	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, putative	
MG_24H_07_E12	-C	7427.t00006	hypothetical protein, conserved	
IB_EP_16_G03	-C	7427.t00006	hypothetical protein, conserved	
MG_24H_09_C09	-B	7624.t00011	cysteine protease, putative	
CTG_186	-B	7714.t00007	transporter, putative	
CTG_1042	-C	8096.t00013	hypothetical protein, conserved	
CTG_1473	-C	8148.t00014	hypothetical protein	
TcBc5.02155	-B	8368.t00023	hypothetical protein, conserved	
CTG_978	-C	8433.t00020	hypothetical protein, conserved	
CTG_2694	-C	8445.t00003	GTPase, putative	
CTG_111	-B	8659.t00005	hypothetical protein, conserved	
CTG_1144	-C	8775.t00012	hypothetical protein, conserved	
IB_ST_01_C11	-B	NA	AAA16806 cytochrome oxidase subunit II [Trypanosoma cruzi]	
MG_ST_15_A09	-B	NA	kDNA	
MG_24H_20_B08	-B	NA	SIRE	
MG_24H_07_B03	-B	NA	TS	
CTG_643	-B	NA	TS	
IB_MT_06_A10	-B	NA	TS	

Legenda: A) Sonda cujo nível de expressão maior que 3 vezes em Amastigota Extracelular em ambas as réplicas biológicas; B) Nível de expressão maior que 3 vezes em uma réplica e maior que 2 vezes em outra. C) Nível de expressão maior que 2 vezes em ambas as réplicas. -A, -B, -C) Mesma lógica, mas com os níveis de expressão diminuídos em Amastigota Extracelular. X) Sonda discrepante, ou seja, a expressão encontra-se aumentada em uma réplica e diminuída em outra, ou vice-versa.

Para facilitar a compreensão dos genes diferencialmente expressos, seus possíveis envolvimento em vias bioquímicas ou funções biológicas, foram criadas categorias funcionais, onde cada gene foi alocado. São elas:

Chaperoninas: proteínas de choque térmico, peptidil-prolil cis-trans isomerase;

Citoesqueleto e Movimentação: proteínas associadas a microtúbulos e microfilamentos;

Metabolismo de lipídios: proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios;

Metabolismo: proteínas envolvidas em oxi-redução, metabolismo de proteínas e açúcares;

Proteinases: carbóxi-peptidases, proteínas do complexo ubiquitina-proteossomo, proteinases de forma geral;

Proteínas de superfície: trans-sialidases, gp63;

Proteínas de membrana e Transportadores: proteínas de membrana plasmática ou de organelas, transportadores de moléculas localizados na membrana plasmática ou membrana de organelas;

Replicação, Reparo, Transcrição e Processamento de RNA: proteínas envolvidas com a replicação e reparo do DNA e kDNA, transcrição de RNA, processamento do transcrito primário, proteínas associadas à cromatina, edição de RNA, histonas, proteínas ligadoras de RNA, proteínas nucleolares;

Sinalização: GTPases, proteína-cinases, proteína-fosfatases;

Tradução e proteínas ribossômicas: proteínas associadas à tradução, proteínas ribossômicas

Proteínas hipotéticas: proteínas assim denominadas pela anotação realizada pelo consórcio TIGR/SBRI/Karolinska (TSK), pois não apresentaram homólogas

Proteínas hipotéticas conservadas: proteínas assim denominadas pelo consórcio TSK, pois foram encontradas homólogas em outros organismos, principalmente, em *T. brucei* e *L. major*.

Na TABELA 4, os genes diferencialmente expressos na comparação entre Amastigota Extracelular e Metacíclico foram agrupados conforme função protéica. É interessante notar que, dos genes envolvidos em vias de síntese de lipídios, cinco encontraram-se com expressão aumentada em amastigota. De maneira semelhante,

entre aqueles envolvidos na replicação, reparo, transcrição e processamento, nove apresentaram expressão aumentada, e dois, expressão diminuída, reforçando a condição metabólica geral mais ativa em Amastigota Extracelular que em Metacíclico. Outra observação interessante foi que uma parte considerável dos genes (31%) codifica para proteínas hipotéticas, sendo que 14 tiveram a expressão aumentada, e nove a expressão diminuída em Amastigota Extracelular.

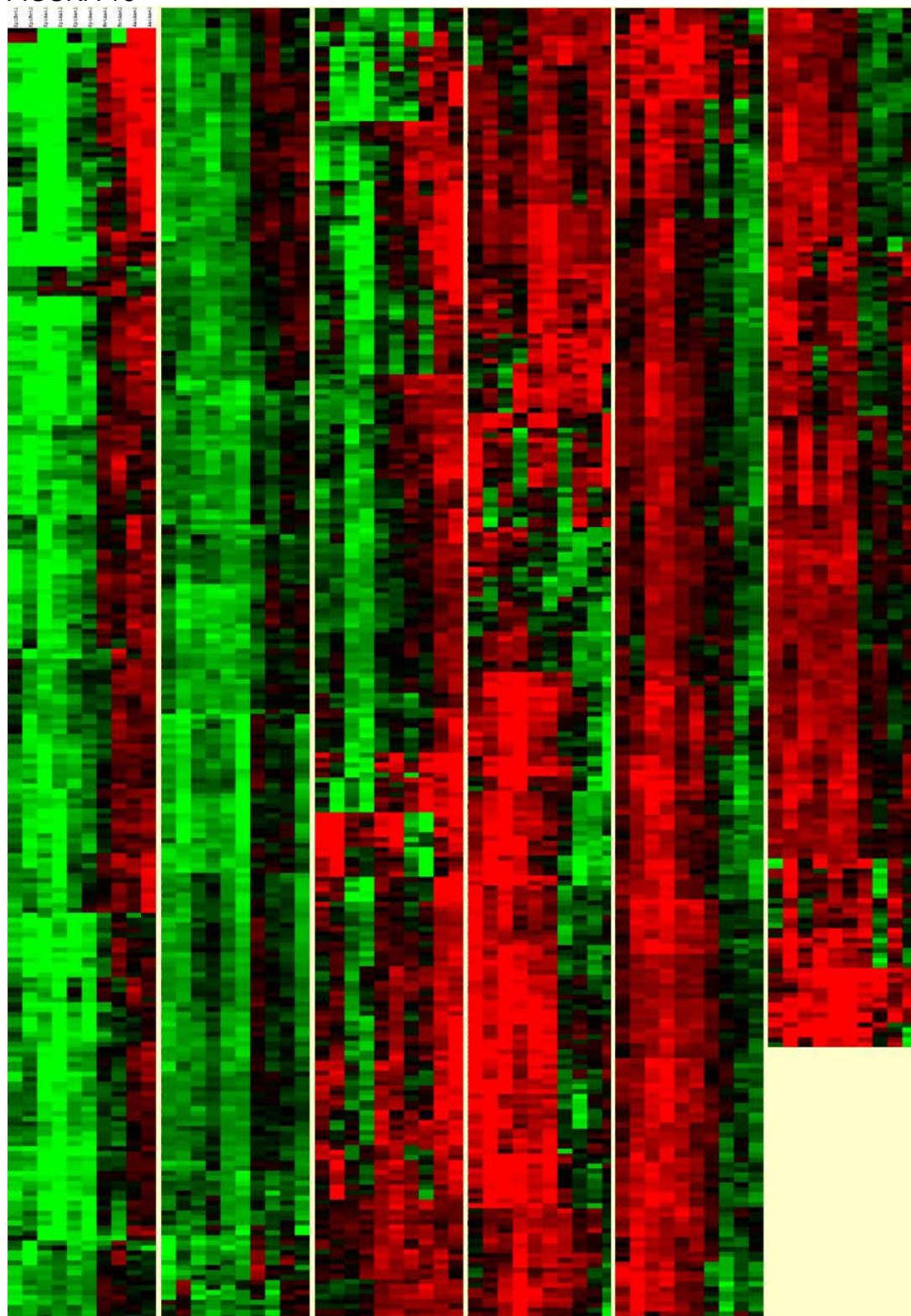
TABELA 4 – QUANTIDADE DE GENES AUMENTADOS E DIMINUÍDOS EM AMASTIGOTA EXTRACELULAR EM RELAÇÃO AO METACÍCLICO, AGRUPADOS SEGUNDO SUA FUNÇÃO.

Função protéica	Aumentados em Amastigota Extracelular (%)	Diminuídos em Amastigota Extracelular (%)
Chaperoninas	1 (1,92)	1 (4,54)
Citoesqueleto e Movimentação	2 (3,84)	0
Metabolismo de lipídio	5 (9,61)	0
Metabolismo	5 (9,61)	4 (18,18)
Proteinases	6 (11,54)	1 (4,54)
Proteínas de superfície	1 (1,92)	1 (4,54)
Proteínas de membrana/Transportadores	2 (3,84)	1 (4,54)
Replicação, Reparo, Transcrição e Processamento	9 (17,3)	2 (9,09)
Sinalização	1 (1,92)	2 (9,09)
Tradução e Proteínas ribossômicas	1 (1,92)	0
Proteínas hipotéticas	3 (5,77)	1 (4,54)
Proteínas hipotéticas conservadas	14 (26,92)	9 (40,9)
Outras	2 (3,84)	0
Total	52	22

Em outra análise, todas as formas foram comparadas com Epimastigota a fim de selecionar os genes que sofriam modulação maior ou igual a duas vezes em ambas as réplicas biológicas de pelo menos uma comparação. A partir dessas, duas outras comparações foram feitas as comparações de interesse: Amastigota Extracelular contra Metacíclico e Amastigota Extracelular contra Amastigota Intracelular. Tais comparações são extremamente importantes, pois no primeiro caso se trata do estágio imediatamente anterior ao amastigota, e no segundo, de sua contraparte originada dentro da célula hospedeira. É bastante relevante saber quão próximos ou distantes são esses estágios, para que o Amastigota Extracelular seja mais bem posicionado no ciclo de vida do *T. cruzi*. O agrupamento hierárquico

selecionou 1526 sondas, muitas delas mostrando um padrão de expressão consistente nas comparações de interesse (Fig. 16).

FIGURA 16



Agrupamento hierárquico de sondas selecionadas através da comparação entre Epimastigotas e os demais estágios do *T. cruzi*. Observa-se o padrão geral de expressão das 1526 sondas selecionadas.

Devido à consistência de algumas regiões na comparação entre Amastigota Extracelular e Amastigota Intracelular revelado pela figura 16, decidiu-se buscar as sondas que se apresentavam moduladas em duas ou mais vezes nesta comparação. Trezentas e sete sondas foram selecionadas por esse critério (Fig. 17) e novamente o comportamento desses genes pôde ser verificado entre as demais comparações.

FIGURA 17

continua

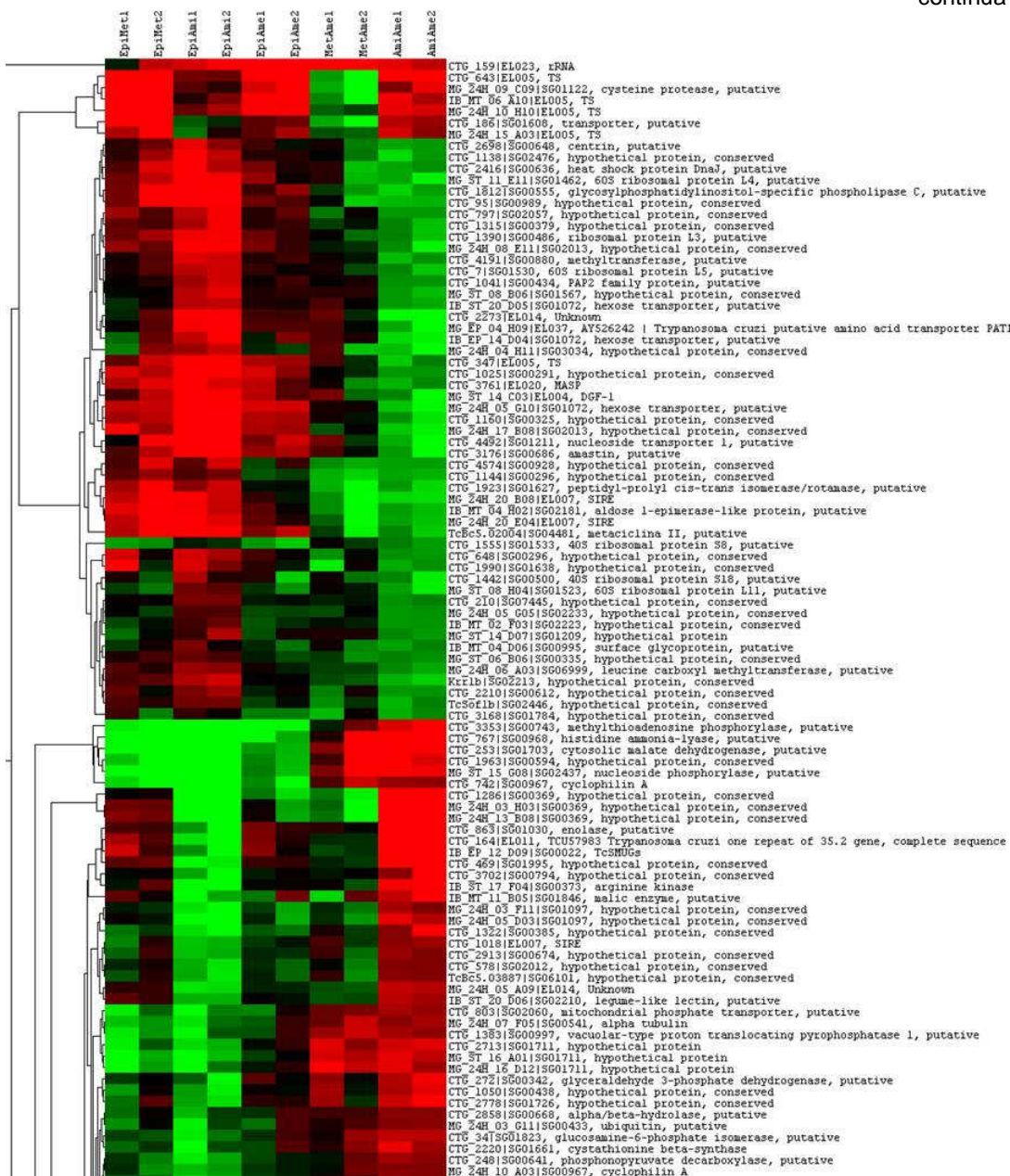


FIGURA 17

continuação

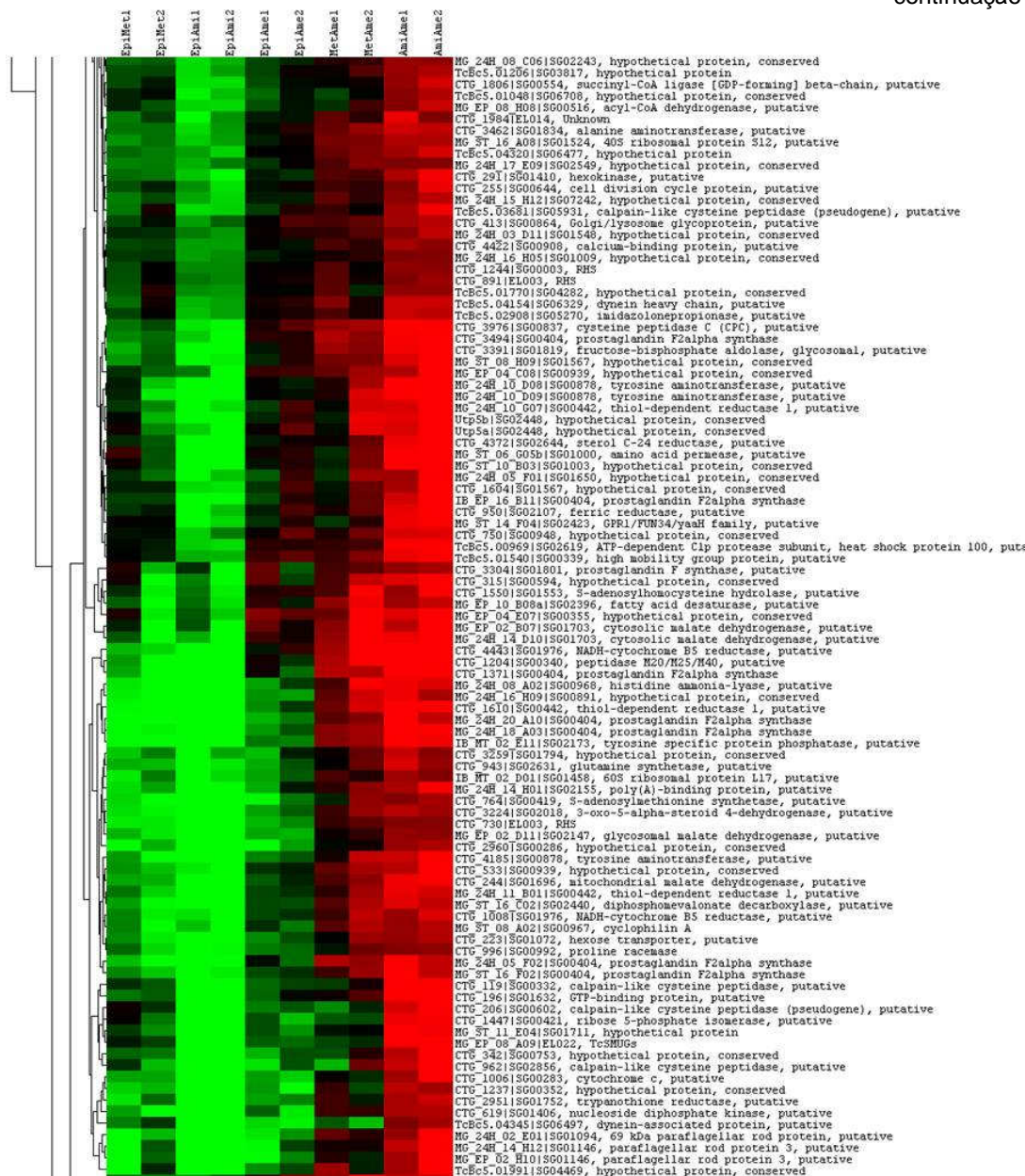
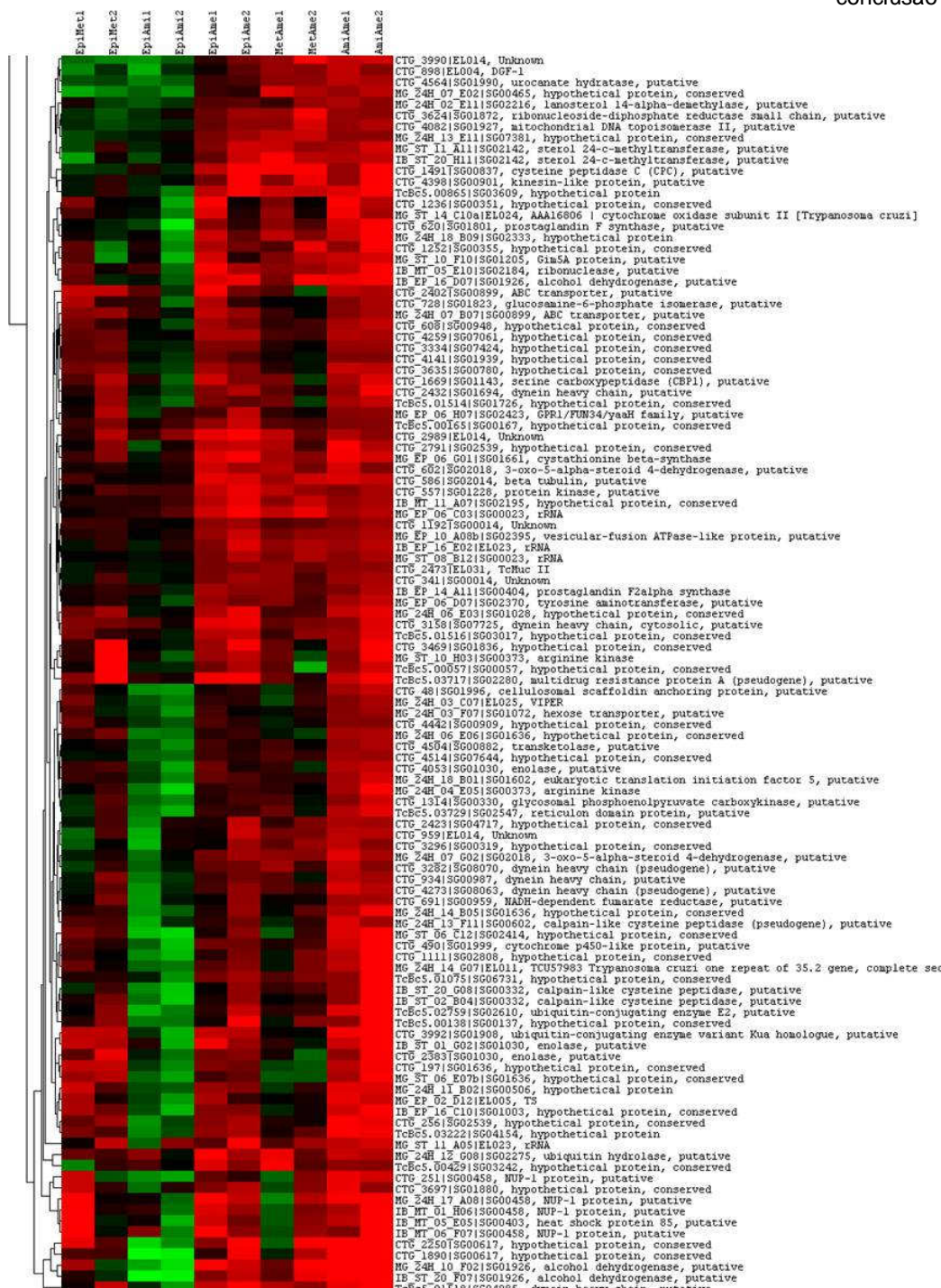


FIGURA 17

conclusão



Agrupamento hierárquico de sondas selecionadas através da comparação entre Amastigota Extracelular e Amastigota Intracelular do *T. cruzi* (oriundas das comparações da Fig. 16). Foram selecionadas 307 sondas que tiveram a expressão de seus genes modulada em duas ou mais vezes (para mais ou para menos), em ambas as réplicas biológicas. As demais comparações permitem uma avaliação geral do nível expressão destes genes entre os demais estágios do *T. cruzi*.

Para complementar as análises entre as formas amastigotas, um novo conjunto de sondas foi selecionado, desta vez buscando os genes que não sofreram alteração entre os amastigotas, mas que foram modulados nas demais formas. Para tal, foi aplicado o critério de que o valor da diferença entre Amastigota Intracelular e Amastigota Extracelular não deveria ser superior a 50% em ambas as réplicas biológicas. Foram selecionadas 342 sondas, cujas expressões podem ser verificadas também entre os demais estágios (Fig. 18). As tabelas contendo os valores das razões de cada sonda selecionada nas figuras 16, 17 e 18 estão disponíveis na forma de arquivo digital no CD em anexo.

FIGURA 18

continua

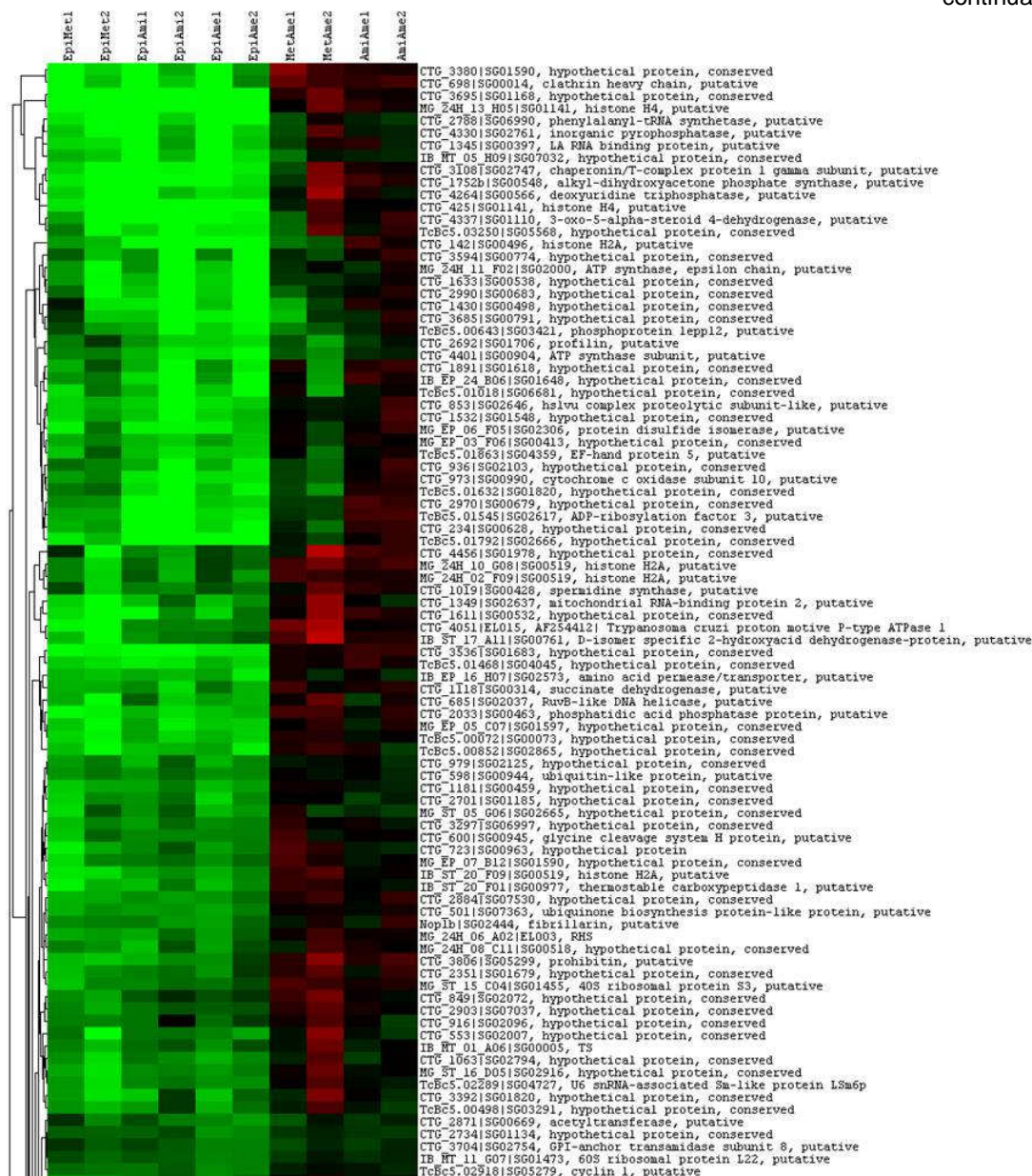


FIGURA 18

continuação

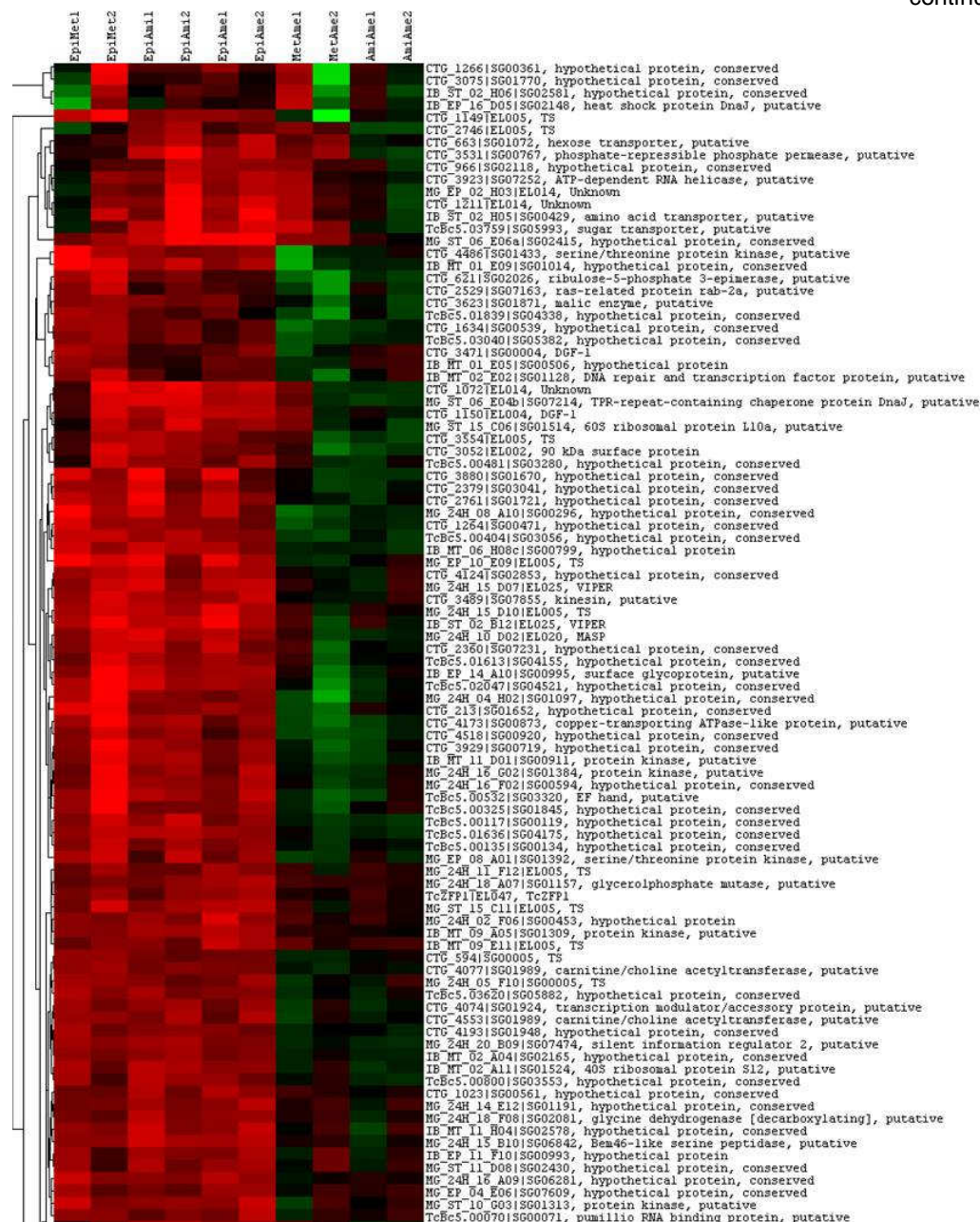
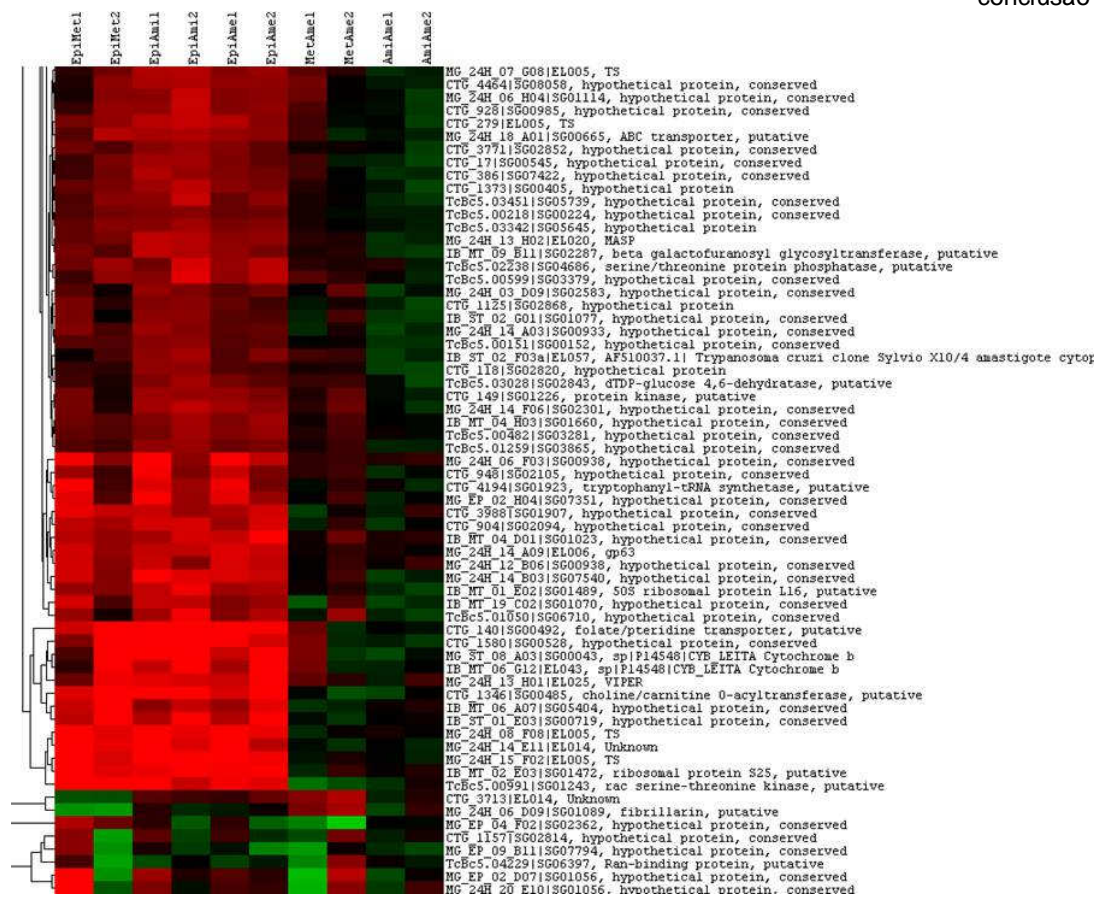


FIGURA 18

conclusão



Agrupamento hierárquico de sondas selecionadas através da comparação entre Amastigota Extracelular e Amastigota Intracelular do *T. cruzi* (oriundas das comparações da Fig. 16). Foram selecionadas 342 sondas que tiveram a expressão de seus genes considerada inalterada, em ambas as réplicas biológicas. Dentre as sondas da Fig. 16, apenas as que tiveram o valor da diferença entre Amastigota Extracelular e Amastigota Intracelular de até 50% foram escolhidas. As demais comparações permitem uma avaliação geral do nível expressão destes genes entre os demais estágios do *T. cruzi*.

5 DISCUSSÃO

5.1 A AMASTIGOGÊNESE

A obtenção das formas amastigotas por meio da amastigogênese extracelular consistiu parte importante deste estudo, pois além de proporcionar quantidades suficientes de parasitas para a realização de diversos experimentos, permitiu também observações do processo de diferenciação. A amastigogênese extracelular já havia sido conseguida anteriormente a partir de tripomastigotas sangüíneos (Kambara *et al.*, 1990; Tomlinson *et al.*, 1995), onde vários fatores, descritos como participantes da diferenciação, atuavam promovendo o estresse fisiológico do parasita. Outros trabalhos mostraram a obtenção de amastigotas a partir de epimastigotas incubados em meios de cultura muito ricos, que podiam conter plasma de galinha, vitaminas, nucleotídeos e soro feral bovino (Pan, 1978; Rondinelli *et al.*, 1988). Entretanto, Contreras e colaboradores (2002) foram os primeiros a obterem amastigotas extracelulares a partir de tripomastigotas metacíclicos, usando o isolado EPm6. Neste trabalho, aplicamos praticamente a mesma metodologia ao clone Dm28c e obtivemos grandes quantidades de formas amastigotas.

As análises morfoestruturais mostraram que os tripomastigotas metacíclicos e os amastigotas apresentavam morfologia esperada para esses estágios (Fig. 3, 5A, 6C). Entre os amastigotas foi possível observar rugosidades bem pronunciadas na superfície (Fig. 7D, 8A, 8C), diferentemente da descrição para amastigotas obtidos de metacíclicos e tripomastigotas do isolado EPm6, cuja superfície apresenta um padrão mais granular e liso, respectivamente (Navarro *et al.*, 2003). Células em divisão e detalhes como o curto flagelo foram facilmente observados (Fig. 8C), indicando que se tratava de formas amastigotas e não de um possível artefato de cultura. Somando-se a isso, a detecção do antígeno Ssp4 (específico para amastigotas), trouxe maior confiabilidade de que se tratava realmente deste estágio do *T. cruzi*.

As mudanças morfológicas ocorridas durante o processo de diferenciação revelaram um padrão ainda não observado em outros experimentos de amastigogênese. Até então, tais mudanças ocorridas nos tripomastigotas e metacíclicos em diferenciação se resumiam em um aparente aumento de volume de uma das extremidades, seguida por um tipo de dobramento em espiral sobre o próprio corpo (Navarro *et al.*, 2003). Além disso, diferentes tipos de rastros eram deixados pelas células em diferenciação, o que pode estar ligado à expressão e perda de antígenos de superfície, relatado por outros autores (Andrews *et al.*, 1987; Barros *et al.*, 1996). No presente estudo, a microscopia de varredura mostrou a formação de uma estrutura semelhante a um broto que cresce até o tamanho aproximado de um amastigota e em seguida se libera da estrutura que o originou de uma maneira que se assemelha à constrição citoplasmática sofrida por células em divisão (Fig. 7A, 7B, 8A). A microscopia de varredura de alta resolução mostrou que em alguns casos, praticamente toda a região do citoplasma do metacíclico foi absorvida pelo amastigota nascente, restando apenas os componentes proteicos formadores do flagelo do metacíclico (Fig. 7C e 7D). Já em outras células, percebeu-se que grande parte da estrutura do antigo estágio metacíclico tenha sido descartada sob a forma de resto celular (Fig. 8A e 8B).

As imagens de microscopia de transmissão sugerem que esteja ocorrendo uma migração das organelas para esse broto, já que o interior dos restos de metacíclicos se mostra menos eletrondenso (Fig. 9A). Mesmo após alcançar a morfologia de amastigota, uma observação mais cuidadosa mostrou que a diferenciação não estava completa para todas as células. Algumas ainda apresentavam o padrão morfológico do cinetoplasto em cesto, característico de metacíclico. Outras já possuíam cinetoplasto em barra, característico de amastigota (Fig. 9B), reforçando o que tem sido observado neste estudo de que a diferenciação não é um evento sincronizado. Apesar do meio de cultura fornecer os sinais e condições necessárias para que as células se transformem, cada uma delas se diferencia em seu próprio momento e outras nem chegam a se diferenciar, mostrando quão individuais são os requisitos necessários para disparar na célula o processo de diferenciação.

Toda essa reorganização morfoestrutural sugeriu o envolvimento de diversos componentes da célula. Elementos do citoesqueleto devem ser fundamentais na

formação do broto, migração das organelas e liberação dos amastigotas. As próprias organelas aparentemente passaram por uma remodelação interna, como observado para as mitocôndrias. O perfil lipídico certamente foi alterado, favorecendo o aparecimento das estruturas pleiomórficas durante a amastigogênese e confirmou a grande plasticidade da membrana plasmática. Para promover tantas mudanças, muitas enzimas devem ter participado ativamente, dentre as quais aquelas envolvidas no metabolismo de lipídios, um dos focos deste trabalho.

5.2 LIPÍDIOS E A AMASTIGOGÊNESE

As significativas mudanças morfoestruturais sofridas pelo metacíclico até sua diferenciação em amastigota possibilitaram sugerir que há diferenças na composição lipídica dos dois estágios. Mudanças no perfil de alguns lipídios durante a diferenciação foram descritas por Bertello e colaboradores (1996), que registraram um aumento nos níveis de ceramida livre em formas amastigotas, se comparadas com tripomastigotas. Essa ceramida é um dos principais constituintes da âncora do antígeno de superfície Ssp-4, marcador específico de amastigota. Salto e colaboradores (2003) também demonstraram que durante a amastigogênese, a membrana plasmática do *T. cruzi* sofre importantes mudanças em componentes lipídicos, particularmente no aumento da produção e remodelação de inositolfosfoceramida e fosfatidilinositol, por fosfolipases e transferases. O uso do inibidor aureobasidina A, que atua na síntese destes compostos em levedura, resulta em baixa na diferenciação (também demonstrado por Figueiredo e colaboradores (2005)), aumento na quantidade de formas intermediárias e falta na expressão do antígeno Ssp-4.

Com base nestas evidências é que se decidiu investigar o perfil lipídico total e de membrana plasmática dos metacíclicos, metacíclicos em diferenciação e amastigotas. Também foram incluídos nas análises os estágios epimastigotas em fase logarítmica (3 dias) e em fase estacionária de cultura (5 dias). A extração e obtenção dos lipídios totais foi relativamente simples e resultou em um perfil contendo ácidos graxos, fosfolipídios e esfingolipídios formados pelos principais grupos polares (colina, inositol, etanolamina) e com cadeias de ácido graxo variando

entre 16 e 18 carbonos, com até duas insaturações. Praticamente todos os lipídios identificados encontraram-se relativamente mais abundantes em amastigotas que em metacíclicos (Tabela I e II). Entretanto, o mesmo não vale para os metacíclicos em diferenciação (Meta-Ama), que apresentaram principalmente maior abundância relativa de liso-lipídios (m/z 476, 478, 504, 554, 556, 595, 597 em modo negativo, e m/z 526 em modo positivo). Tal fato sugeriu o envolvimento de enzimas como fosfolipase A₂ (PLA₂) durante a diferenciação, que agem clivando a segunda cadeia de ácido graxo dos fosfolipídios, originando liso-fosfolipídio e ácido aracdônico. As duas moléculas podem desempenhar funções estruturais e sinalizadoras durante a amastigogênese, semelhantemente ao que foi descrito para um tipo de fosfolipase C de *T. cruzi*. Tal enzima, localizada na membrana plasmática e específica para fosfatidilinositídeos, é ativada durante a transformação de tripomastigota para amastigota. Quando sua expressão é manipulada através de inibição ou superexpressão, alterações significativas na taxa de amastigogênese são observadas (Furuya *et al.*, 2000; Okura *et al.*, 2005). No entanto, é interessante mencionar a atividade citotóxica de alguns liso-fosfolipídios contra uma variedade de células tumorais. Tal efeito lítico foi verificado nos três estágios do *T. cruzi* por Santa-Rita e colaboradores (2000), além de inibição na diferenciação de epimastigotas para tripomastigota e na proliferação de amastigotas localizados no interior de células cardíacas. Análises ultra-estruturais indicaram que a membrana plasmática é o principal alvo destes liso-fosfolipídios.

As PLA₂ têm sido descritas como participantes em alguns eventos na fisiologia do *T. cruzi*. Adesão à célula hospedeira é um deles, uma vez que parasitas tratados com a enzima apresentam adesão aumentada, mas se fosfatidilcolina (que é um substrato para PLA₂) for acrescentada ao meio, a adesão diminui (Connelly *et al.*, 1984). Outro ponto atribuído a PLA₂ é o aumento da fluidez da membrana plasmática da célula hospedeira e do vacúolo parasitóforo, visando facilitar primeiramente a invasão e em seguida o escape para o citoplasma, uma vez que o uso de glangliosídeos (inibidores da PLA₂) compromete esses eventos (Bronia *et al.*, 1999). Seguindo esta linha de pensamento, foi levantada a possibilidade da PLA₂ estar envolvida na mudança do perfil lipídico do *T. cruzi* e de sua membrana plasmática, alterando as características de fluidez. Tais mudanças favoreceriam a ocorrência do padrão morfológico (até então não descrito) observado durante a

amastigogênese, ou seja, o início e desenvolvimento do brotamento, a migração das organelas e liberação do amastigota.

Para verificar as hipóteses acima, além dos lipídios totais seria preciso obter amostras purificadas de membrana plasmática para extrair os lipídios e determinar seu perfil. Os protocolos disponíveis na literatura para fracionamento celular de tripanosomatídeos, baseados em centrifugação diferencial e gradiente de sacarose (Pereira *et al.*, 1978; Franco da Silveira e Colli, 1981) foram adaptados e usados, porém, sem sucesso. Dificuldades surgiram na etapa de lise dos parasitas, que nos protocolos originais era feita na presença de detergente, o que era proibido em nosso caso, pois os lipídios eram o alvo do estudo. Também foi difícil conseguir quantidade de material suficiente para fazer a extração de lipídios, os testes morfoestruturais e ensaios de marcadores enzimáticos para as frações obtidas, a fim de verificar a pureza das amostras de interesse. Assim, surgiu a idéia de se usar biotina para marcar as proteínas de superfície e após a lise do parasita, usar uma coluna de estreptavidina para recuperar essas proteínas contendo amostras de lipídios da membrana plasmática. Alguns pontos da técnica precisavam ser esclarecidos: não se sabia, por exemplo, se a biotina marcaria a superfície celular como um todo, ou se a marcação ficaria sujeita a regiões específicas da membrana. Também era desconhecido se haveria marcação de biotina endógena e se o padrão de marcação seria o mesmo para os diferentes estágios do *T. cruzi*. Essas questões foram relevantes, pois indicavam se as amostras obtidas seriam boas representantes da membrana plasmática. Através de microscopia confocal (Fig. 13) ficou claro que a marcação do *T. cruzi* com a biotina se dava de forma homogênea em toda a superfície, que não havia sinal de marcação de biotina endógena no parasita e que o padrão de marcação era semelhante para epimastigotas, metacíclicos e amastigotas. Ensaios de *Western blot* confirmaram esse último dado e revelaram moléculas cujas massas correspondiam a glicoproteínas de superfície (Fig. 15), indicando que a técnica pretendida era viável.

Essa nova estratégia de purificação foi aplicada aos epimastigotas e mostrou ser promissora, à medida que várias espécies lipídicas foram obtidas e identificadas tanto nesta amostra de membrana, que representa uma fração dos lipídios totais, como na amostra contendo os lipídios totais da célula. Entretanto, a metodologia precisa ser aperfeiçoada, especialmente a etapa da lise dos parasitas, que

consideramos crucial para a obtenção de amostras que representem o mais fielmente possível a membrana plasmática do *T. cruzi*.

Além das funções estruturais que os fosfolipídios desempenham na membrana plasmática, há também as funções mais ligadas à fisiologia e às vias de sinalização celular. Dentre os fosfolipídios, um deles se destaca no desempenho destas funções: a fosfatidilserina. Um tema de interesse de nosso grupo é o estudo do papel da fosfatidilserina como molécula sinalizadora com importante papel na interação com a célula hospedeira. Há pouco tempo, esta molécula foi relacionada com a capacidade que alguns protozoários parasitas tem de subverter os sistemas de defesa das células hospedeiras. Dentre elas destaca-se a do TGF- β (Reed, 1999), que é secretado por macrófagos infectados e está envolvido em várias vias de escape em diversos patógenos. A exposição de fosfatidilserina pela *Leishmania amazonensis* (de Freitas Balanço *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006), pelo *Toxoplasma gondii* (Seabra *et al.*, 2004) e pelo *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al.*, 2006) é relacionada à secreção de TGF- β por macrófagos infectados, mimetizando assim uma célula apoptótica numa resposta antiinflamatória (Fadok *et al.*, 1998). DaMatta e colaboradores (2006) demonstraram que dentre os estágios evolutivos do *T. cruzi*, apenas tripomastigotas (provenientes de cultura de célula, do sangue ou de metaciclogênese *in vitro*) expõem fosfatidilserina. Apesar dos amastigotas serem considerados infectivos, não foi detectada tal capacidade sugerindo que eles sejam menos propícios a escapar das defesas da célula hospedeira (quando comparados aos tripomastigotas) ou que eles lancem mão de outros mecanismos para este fim.

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A análise do transcrito das formas amastigotas permitiu selecionar inicialmente 52 genes cuja expressão encontrava-se alterada entre metacíclicos e amastigotas (tabela 3). Foi possível agrupar tais genes de acordo com o conhecimento que se tem sobre suas funções, o que resultou, nas formas metacíclicas, numa esperada diminuição na expressão de genes envolvidos em processos metabólicos gerais. O número de genes selecionados nesta primeira análise pode parecer pequeno, considerando que se trata de estágios tão distintos

do *T. cruzi*. Entretanto, é válido ressaltar que o critério de seleção usado foi bastante rigoroso, reunindo apenas os genes cuja expressão se mostrou pelo menos duas vezes mais elevada. Portanto, esse número de genes deve ser bem maior que 52.

Outro aspecto importante a se ressaltar é o fato de um gene ser classificado como diferencialmente expresso, não implica necessariamente em aumento na quantidade de sua respectiva proteína, ou na atividade de determinada via biológica, dado que o *turnover* de um transcrito e da proteína por ele codificada pode ser bem distinto. De fato, é bem sabido que os tripanosomatídeos sofrem uma preponderante regulação pós-transcricional na expressão de seus genes, e uma grande quantidade de mRNA nem sempre significa altos níveis de produção de proteína. Assim, outras abordagens são necessárias para confirmar e complementar as informações fornecidas pelo microarranjo. Alguns dados de expressão diferencial, obtidos com o microarranjo de DNA desenvolvido no IBMP, foram validados pela técnica de PCR em tempo real, revelando uma boa concordância entre os dois métodos. Tal resultado contribuiu para o aumento da confiabilidade dos resultados de microarranjo obtidos no IBMP, mas não dispensa o uso de outras ferramentas para investigações mais detalhadas. Uma análise proteômica poderia prover importantes informações sobre a real diversidade entre as formas amastigotas e as formas tripomastigotas metacíclicas.

Com os gráficos de agrupamento hierárquico contendo dados dos demais estágios do *T. cruzi* (Fig. 17), ficou aparente que alguns grupos de genes tinham sua expressão modulada de forma consistente em certos estágios, mas não em outros. Como um dos propósitos do trabalho é a comparação entre os estágios amastigota extracelular e intracelular, uma análise mais detalhada dos genes modulados entre eles foi realizada, mostrando novamente padrões bastante consistentes de expressão em ambos os estágios (Fig. 18). Isso indica que os mesmos grupos de genes estão tendo sua expressão aumentada ou diminuída nas duas formas amastigotas em questão, sugerindo assim que os amastigotas extracelulares de cultivo axênico assemelham-se às formas obtidas pela infecção de células em cultivo. Para reforçar esta proposição, o agrupamento seguinte, que buscou genes não modulados em amastigotas extracelulares e intracelulares, mais uma vez selecionou uma quantidade significativa de genes, indicando a similaridade entre as duas amostras (Fig. 19).

Esses dados, apesar de preliminares, são relevantes, pois fornecem indicativos de que através da amastigogênese extracelular, é possível obter formas amastigotas provenientes de tripomastigotas metacíclicos. Do ponto de vista prático este resultado é relevante, pois permite o estudo em condições bem controladas de um dos eventos mais importantes na infecção pelo *T.cruzi* que é a etapa de transformação de metacíclicos em amastigotas. Alguns aspectos desta diferenciação inicial podem ser exclusivos e determinantes para o grande sucesso infectivo do *T. cruzi*. A existência e o bom funcionamento de um sistema axênico, mais controlável, de obtenção de amastigotas (que foi a base para este trabalho) podem facilitar a compreensão deste momento crucial e determinante para o parasita.

As informações contidas nos resultados de análise do transcrito de amastigotas extracelulares devem ser mais bem exploradas. Os genes que se mostrarem relevantes para o processo de diferenciação precisam ser identificados e melhor estudados através do emprego de outras ferramentas de biologia celular e molecular. Além de contribuir com conhecimentos de ciência básica, tais estudos podem favorecer o surgimento de novos paradigmas relacionados ao controle e tratamento da doença de Chagas.

6 CONCLUSÃO

Com os dados produzidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A Amastigogênese Extracelular (Contreras *et al.*, 2002) é um método viável para se obter, de maneira axênica, quantidades consideráveis de formas amastigotas, partindo-se de tripomastigotas metacíclicas;
- A diferenciação para amastigota envolve extensas modificações morfoestruturais, descritas pela primeira vez ao se usar este sistema. Dentre elas podem-se destacar aquelas ocorridas na superfície;
- As modificações estruturais podem estar relacionadas às aquelas ocorridas no perfil lipídico do parasita, em que liso-lipídios são relativamente mais abundantes durante o processo de diferenciação para amastigotas, podendo contribuir em nível estrutural e de sinalização celular;
- É muito possível que fosfolipases do tipo A₁ e A₂ estejam envolvidas na diferenciação e sejam responsáveis pelo aumento na quantidade relativa de liso-lipídios presentes nas formas intermediárias;
- A estratégia de se obter amostras de membrana plasmática do *T. cruzi* através da captura de proteínas integrais e ancoradas, pelo método da biotina/avidina, se mostrou promissora, muito mais simples e até mesmo econômica que os métodos mais tradicionais, baseados em gradientes de densidade;
- A análise do transcrito de epimastigota extracelular permite sugerir uma considerável proximidade filogenética com amastigota intracelular, além de expor alguns genes cujas características e funções precisam ser estudadas.

7 PERSPECTIVAS

Este trabalho apresentou diferentes aspectos relacionados à amastigogênese induzida em um sistema axênico, a partir de tripomastigotas metacíclicos do clone Dm28c. No entanto, resta saber como se comportam outras cepas importantes do *T. cruzi* quando submetidas ao mesmo modelo de diferenciação. Assim será possível determinar a abrangência da técnica como ferramenta para se estudar este momento importante para o parasita, que reflete parte de seu sucesso evolutivo.

Apesar das mudanças morfoestruturais terem sido bem documentadas, análises mais detalhadas dos componentes da célula em intervalos de tempo mais reduzidos permitirão averiguar o comportamento de cada um deles durante a diferenciação. Isso por si só já abre um vasto campo para investigações.

A mudança no perfil lipídico total do parasita precisa ser melhor caracterizada e os dados aqui apresentados, confirmados, especialmente no que diz respeito aos lipídios de membrana plasmática. Entre eles podemos destacar o ergosterol, cuja via biossintética tem sido alvo de estudos e desenvolvimento de agentes quimioterápicos. Outro ponto a se olhar com interesse é a função sinalizadora e não apenas estrutural dos lipídios. Com mais freqüência aparecem trabalhos feitos principalmente em *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* direcionados a esse tema, mudando, de certa forma, a maneira como os lipídios são encarados. Ainda nesta linha, estão as enzimas que orquestram tais mudanças que podem representar, junto com os lipídios, pontos importantes para o desenvolvimento de novas abordagens de tratamento da doença de Chagas, uma vez que alguns destes lipídios e vias metabólicas não estão presentes em mamíferos.

Os dados de expressão gênica deram uma boa visão da proximidade entre amastigotas e demais estágios, além dos genes diferentemente expressos na comparação com metacíclicos. Entretanto, esses estudos precisam alcançar o nível de expressão de proteínas, a fim de se conhecer melhor a função e os mecanismos regulatórios envolvidos na expressão das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-SERRANO, A.; SCHENKMAN, S.; YOSHIDA, N.; MEHLER, A.; RICHARDSON, J. M.; FERGUSON, M. A. J. The lipid structure of the GPI-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. **J. Biol. Chem.**, 270, 27244–27253, 1995.

ALMEIDA-DE-FARIA, M.; FREYMÜLLER, E.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an Intracellular Epimastigote-like Form **Exp. Parasitology**, 92, 263–274, 1999.

ALMEIDA, I. C.; CAMARGO, M. M.; PROCOPIO, D. O.; SILVA, L. S.; MEHLERT, A.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T.; FERGUSON, M. A. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO J.**, 19(7), 1476-85, 2000.

ANDREWS, N. W. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Braz J Med Biol Res.**, 27(2), 471-475, 1994.

ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A. *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, 61, 1277–1287, 1990.

ANDREWS, N. W.; HONG, K.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, 64, 474-484, 1987.

ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; LEY, V.; HONG, K. S.; NUSSENZWEIG, V. Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, 167(2), 300-14, 1988.

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Mol Biochem Parasitol.**, 33, 249–56, 1989.

AVILA, A. R.; YAMADA-OGATTA, S. F.; DA SILVA MONTEIRO, V.; KRIEGER, M. A.; NAKAMURA, C. V.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 117(2), 169-77, 2001.

AVILA, J. L.; BRETANA, A.; CASANOVA, M. A.; ÁVILA, A.; RODRIQUEZ, F. *Trypanosoma cruzi*: defined medium for continuous cultivation of virulent parasites. **Exp. Parasitol.**, 48, 27–35, 1979.

AVILA, J. L.; PEREZ-KEPP, R.; BRETANA, A. A minimal medium for the cultivation of infective *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **J. Gen. Microbiol.**, 129, 285–291, 1983.

AYMERICH, S.; GOLDENBERG, S. The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. **Exp. Parasitol.**, 69, 107-115, 1989.

- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J. Royal Stat. Soc.**, 57, 289-300, 1995.
- BARROS, H. C.; DA SILVA, S.; VERBISCK, N. V.; ARAGUTH, M. F.; TEDESCO, R. C.; PROCOPIO, D. O.; MORTARA, R. Release of membranebound trail by *Trypanosoma cruzi* amastigotes onto modified surface and mammalian cells. **J. Euk. Microbiol.**, 43, 275-285, 1996.
- BATES, E. J.; KNUEPFER, E.; SMITH, D. F. Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. **Nucleic Acids. Res.**, 28(5), 1211-20, 2000.
- BERBEROF, M.; VANHAMME, L.; PAYS, E. *Trypanosoma brucei*: a preferential splicing at the inverted polyadenylation site of the VSG mRNA provides further evidence for coupling between trans-splicing and polyadenylation. **Exp. Parasitol.**, 80(3), 563-567, 1995.
- BERTELLO, L. E.; ANDREWS, N. W.; DE LEDERKREMER, R. M. Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 79(2), 143-51, 1996.
- BLACKBURN, E. H.; CHALLONER, P. B. Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. **Cell**, 36(2), 447-57, 1984.
- BLATTNER, J.; CLAYTON, C. E. The 3'-untranslated regions from the *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase-encoding genes mediate developmental regulation. **Gene**, 162(1), 153-156, 1995.
- BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-Substrate Adhesion during *Trypanosoma cruzi* Differentiation **The Journal of Cell Biology**, 106,1349-1358, 1988.
- BORST, P. Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. **Annu Rev Biochem.**, 55, 701-32, 1986.
- BRINGAUD, F.; BALTZ, T. Differential regulation of two distinct families of glucose transporter genes in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell. Biol.**, 13, 1146-1154, 1993.
- BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABE, C.; DOUZERY, E. J.; BERKVENS, D.; SERRANO, M.; DE CARVALHO, M. R.; BUCK, G. A.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infect. Genet. Evol.**, 2(3),173-83, 2003.
- BRONIA, D. H.; PEREIRA, B. M.; LUJAN, H. D.; FRETES, R. E.; FERNANDEZ, A.; PAGLINI, P. A. Ganglioside treatment of acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice promotes long-term survival and parasitological cure. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 93(4), 341-50, 1999.
- BUTLER, J. S. The yin and yang of the exosome. **Trends Cell. Biol.**,12(2), 90-6, 2002.
- CAMARGO, M. E. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 12, 93-100, 1964.

CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R.; YU, M. C. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. **Parasitol. Today**, 16, 78–82, 2000.

CANO, M. I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTÉS, A.; LEVIN, M. J.; GONZALEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; RAMIREZ, J. L.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M.; FRANCO DA SILVEIRA, J. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 71, 273–278, 1995.

CAVALLESCO, R.; PEREIRA, M. E. A. Antibody to *Trypanosoma cruzi* neuraminidase enhances infection in vitro and identifies a subpopulation of trypomastigotes. **J. Immunol.**, 140, 617–625, 1988.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1, 159–218, 1909.

CITRI, N.; GROSSOWICZ, N. A partially defined culture medium for *Trypanosoma cruzi* and some other haemoflagellates. **J. Gen. Microbiol.**, 13, 273–278, 1955.

CONNELLY, M. C.; KIERSZENBAUM, F. Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A2-sensitive components of the parasite membrane. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 121(3), 931–939, 1984.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 3, 315–327, 1985.

CONTRERAS, V. T.; NAVARRO, M. C.; DE LIMA, A. R.; ARTEAGA, R.; DURAN, F.; ASKUE, J.; FRANCO, Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, 8, 1213–1220, 2002.

DALLAGIOVANNA, B.; PLAZANET-MENUT, C.; OGATTA, S. F.; AVILA, A. R.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. **Exp. Parasitol.**, 99(1), 7–16, 2001.

DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H.; DEOLINDO, P.; ARNHOLDT, A. C.; MANHAES, L.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. **FEMS Microbiol. Lett.**, 266(1), 29–33, 2007.

DAS, A.; BELLOFATTO, V. RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 100, 80–85, 2003.

DE AZEVEDO, H. P.; ROITMAN, I. Growth of the Y strain of *Trypanosoma cruzi* in an HX-25-modified defined medium. **J. Parasitol.**, 63, 485, 1977.

DE FREITAS BALANÇO, J. M.; MOREIRA, M. E.; BONOMO, A.; BOZZA, P. T.; AMARANTE-MENDES, G.; PIRMEZ, C.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr. Biol.**, 11, 1870–1873, 2001.

DE LANGE, T.; KOOTER, J. M.; MICHELS, P. A.; BORST, P. Telomere conversion in trypanosomes. **Nucleic Acids Res.**, 11(23), 8149–65, 1983.

DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastid Biology and Disease**, 1(1), 3, 2002.

D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes. **J. Biol. Chem.**, 276 (37), 34801-34809, 2001.

DUNBAR, D. A.; CHEN, A. A.; WORMSLEY, S.; BASERGA, S. J. The genes for small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* are organized in clusters and are transcribed as a polycistronic RNA, **Nucleic Acids Res.**, 28, 2855–2861, 2000.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, 309 (5733), 409-415, 2005.

EISEN, M. B.; SPELLMAN, P. T.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 95, 14863-8, 1998.

ESTÉVEZ, A. M.; KEMPF, T.; CLAYTON, C. The exosome of *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, 20(14), 3831-3839, 2001.

ESTEVEZ, M. G.; GONZALES-PERDOMO, M.; ALVIANO, C. S.; ANGLUSTER, J.; GOLDENBERG S. Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 50(1-2), 31-4, 1989.

EVERS, R.; CORNELISSEN, A. W. C. A. The *Trypanosoma brucei* protein phosphatase gene: polycistronic transcription with the RNA polymerase II largest subunit gene. **Nucleic Acids Res.**, 18, 5089–5095, 1990.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; KONOWAL, A.; FREED, P. W.; WESTCOTT, J. Y.; HENSON, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. **J. Clin. Invest.**, 101, 890–898, 1998.

FANTONI, A.; DARE, A. O.; TSCHUDI, C. RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. **Mol. Cell Biol.**, 14, 2021–2028, 1994.

FAUCHER, J. F.; BALTZ, T.; PETRY, K. G. Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, 81, 441–443, 1995.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. B.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 58, 807-811, 1998.

FIGUEIREDO, J. M.; DIAS, W. B.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; HEISE, N. Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, 387(Pt 2), 519-29, 2005.

FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; DE ISOLA, E. D.; LAMMEL, E.; MEINARDI, E.; BRENNER, R. R.; RASMUSSEN, L. Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 88(1-2), 25-33, 1997.

FRANCO DA SILVEIRA, J.; COLLI, W. Chemical composition of the plasma membrane from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochim. Biophys. Acta.**, 644(2), 341-50, 1981.

FURGER, A.; SCHURCH, N.; KURATH, U.; RODITI, I. Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. **Mol. Cell Biol.**, 17(8), 4372-4380, 1997.

FURUYA, T.; KASHUBA, C.; DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of *Trypanosoma cruzi* that is lipid modified and activated during trypomastigote to amastigote differentiation. **J. Biol. Chem.**, 275(9), 6428-6438, 2000.

GAUNT, M. W.; YEO, M.; FRAME, I. A.; STOTHARD, J. R.; CARRASCO, H. J.; TAYLOR, M. C.; MENA, S. S.; VEAZEY, P.; MILES, G. A.; ACOSTA, N.; DE ARIAS, A. R.; MILES, M. A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, 421(6926), 936-939, 2003.

GIBSON, W. C.; MILES, M. A. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J.**, 5, 1299-1305, 1986.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Exp. Parasitol.**, 66, 205-212, 1988.

GRAMS, J.; MORRIS, J. C.; DREW, M. E.; WANG, Z.; ENGLUND, P. T.; HAJDUK, S. L. A trypanosome mitochondrial RNA polymerase is required for transcription and replication, **J. Biol. Chem.**, 277, 16952–16959, 2002.

GUNZL, A.; BRUDERER, T.; LAUFER, G.; SCHIMANSKI, B.; TU, L. C.; CHUNG, H. M.; LEE, P. T.; LEE, M. G. RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, 2, 542–551, 2003.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, 12, 108-114, 1996.

HENRIKSSON, J.; PETTERSON, U.; SOLARI, A. *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. **Exp. Parasitol.**, 77, 334-348, 1993.

HENRIKSSON, J.; PORCEL, B.; RYDAKER, M.; RUIZ, A.; SABAJ, V.; GALANTI, N.; CAZZULO, J. J.; FRASCH, A. C. C.; PETTERSSON, U. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 73, 63-74, 1995.

HERRERA, E. M.; MING, M.; ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M. E. A. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 65, 73-83, 1994.

HOTCHKISS, T. L.; NERANTZAKIS, G. E.; DILLS, S. C.; SHANG, L.; READ, L. K. *Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5 untranslated region sequence elements. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 98(1), 117-29, 1999.

HOTZ, H. R.; HARTMANN, C.; HUOBER, K.; HUG, M.; CLAYTON, C. Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation. **Nucleic Acids Res.**, 25(15), 3017-3026, 1997.

HUANG, J.; VAN DER PLOEG, L. H. T. Maturation of polycistronic pre-mRNA in *Trypanosoma brucei*: analysis of trans-splicing and poly(A) addition at nascent RNA transcripts from the hsp70 locus. **Mol. Cell. Biol.**, 11, 3180-3190, 1991.

HUG, M.; HOTZ, H. R.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor. **Mol. Cell. Biol.**, 14, 7428-7435, 1994.

ISOLA, E. L. D.; LAMMEL, E. M.; GONZALEZ CAPPA, S. M. *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. **Exp. Parasitol.**, 62, 329-335, 1986.

JUNQUEIRA, A. C.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends Parasitol.**, 21, 270-272, 2005

KAMBARA, H.; UEMURA, H.; NAKAZAWA, S.; FUKAMA, T. Effect of low pH on transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote. **Japan J. Parasitol.**, 39, 226-228, 1990.

KANEDA, S.; HOUR-YOUNG, C.; YAZAWA, K.; TAKAHASHI, K.; MIKAMI, Y.; ARAI, T. Antitumor activity of new semisynthetic saframycin derivatives. **Jpn. J. Cancer Res.**, 77(10), 1043-1049, 1986.

KAPOTAS, N.; BELLOFATTO, V.; Differential response to RNA trans-splicing signals within the phosphoglycerate kinase gene cluster in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Res.**, 21(17), 4067-4072, 1993.

KLEFFMANN, T.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G. A. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. **J. Eukaryot. Microbiol.**, 45(5), 548-555, 1998.

KOFOID, C. A.; WOOD, F. D.; MCNEIL, E. The cycle of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture of embryonic heart muscle. **Univ. Calif. Publ. Zool.**, 41, 23–24, 1935.

KÖNIG, E.; DELIUS, H.; CARRINGTON, M.; WILLIAMS, R. O.; RODITI, I. Duplication and transcription of procyclin genes in *Trypanosoma brucei*, **Nucleic Acids Res.**, 17, 8727–8739, 1989.

KOOY, R. F.; ASHALL, F.; VAN DER PLOEG, M.; OVERDULVE, J. P. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 36, 73–76, 1989

LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S. M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes Dev.**, 7, 996–1007, 1993.

LIANG, X. H.; LIU, Q.; MICHAELI, S. Small nucleolar RNA interference induced by antisense or double-stranded RNA in trypanosomatids. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 100, 7521–7526, 2003.

LEY, V.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N. W. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J Exp Med.**, 171, 401–413, 1990.

LIMA, A. P. C. A.; ALMEIDA, P. C.; TERSARIOL, I. L. S.; SCHMITZ, V.; SCHMAIER, A. H.; JULIANO, L.; HIRATA, I.Y.; MÜLLER-ESTERL, W.; CHAGAS, J. R.; SCHARFSTEIN, J. Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. **J. Biol. Chem.**, 277, 5875–5881, 2002.

LUKES, J.; GUILBRIDE, D. L.; VOTYPKA, J.; ZIKOVA, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P. T. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Euk. Cell.**, 1, 495–502, 2002.

LUO, H.; BELLOFATTO, V. Characterization of two protein activities that interact at the promoter of the trypanosomatid spliced leader RNA. **J. Biol. Chem.**, 272, 33344–33352, 1997.

MELO, E. O.; DHALIA, R.; MARTINS DE SA, C.; STANDART, N.; DE MELO NETO, O. P. Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. **J. Biol. Chem.**, 278(47), 46357–46368, 2003.

McANDREW, M.; GRAHAM, S.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Testing promoter activity in the trypanosome genome: isolation of a metacyclotype VSG promoter, and unexpected insights into RNA polymerase II transcription, **Exp. Parasitol.**, 90, 65–76, 1998.

MARCHETTI, M. A.; TSCHUDI, C.; SILVA, A.; ULLU, E. Physical and transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* genome reveals a typical eukaryotic arrangement with close interspersed of RNA polymerase II- and III-transcribed genes, **Nucleic Acids Res.**, 26, 3591–3598, 1998.

MACEDO, A. M.; MARTINS, S. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 55, 147–154, 1992.

MACHADO, C. A.; AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 98(13), 7396–7401, 2001.

MANQUE, P. M.; NEIRA, I.; ATAYDE, V. D.; CORDERO, E.; FERREIRA, A. T.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; RAMIREZ, M.; YOSHIDA, N. Cell adhesion and Ca²⁺ signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stagespecific surface molecule gp82. **Infect. Immun.**, 71, 1561–1565, 2003.

MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes Dev.**, 8, 491–501, 1994.

McDANIEL, J. P.; DVORAK, J. A. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 57, 213–222, 1993.

MEIRELLES, M. N.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S. G.; COSTA, E. M.; MURTA, A. C.; SCHARFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (gp57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vivo. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 52, 175–184, 1992.

MILES, M. A. The epidemiology of South American typanosomiasis - Biochemical and immunological approaches and their relevance to control. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 77, 5–23., 1983.

MING, M.; CHUENKOVA, M.; ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M. E. A. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 59, 243–252, 1993.

MITCHELL, P.; TOLLERVEY, D. mRNA stability in eukaryotes. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, 10(2), 193–8, 2000.

MOREL, C. M.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 77, 6810–6814, 1980.

MORRIS, D. R.; KAKEGAWA, T.; KASPAR, R. L.; WHITE, M. W. Polypyrimidine tracts and their binding proteins: regulatory sites for posttranscriptional modulation of gene expression. **Biochemistry**, 32, 2931–2937, 1993.

MURTA, A. C.; PERSECHINI, P. M.; PADRON, T. S.; SOUZA, W.; GUIMARÃES, J. A.; SCHARFSTEIN, J. Structural and functional identification of gp57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 43, 27–38, 1990.

NAVARRO, M. C.; DE LIMA, A. R.; ASKUE, J.; CONTRERAS, V. T. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 98(1), 83–91, 2003.

NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **Int. J. Parasitol.**, 32, 405–414, 2002.

NEVA, F. A.; MALONE, M. F.; MEYERS, B. R. Factors influencing the intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 10, 140–149, 1961.

NICOLLE, C. Culture du parasite du bouton d'Orient. **C. R. Acad. Sci.**, 146, 842–843, 1908.

NITZ, N.; GOMES, C.; ROSA, A. C.; D'SOUZA-AULT, M. R.; MORENO, F.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. L. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: Insights into human Chagas disease. **Cell**, 118, 175-186, 2004.

NORTON, A. N. Polypyrimidine tract sequences direct selection of alternative branch sites and influence protein binding. **Nucleic Acids Res.**, 22, 3854–3860, 1994.

NOVY, F. G.; MCNEAL, W. J. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. **J. Infect. Dis.**, 1, 1–30, 1904.

NOZAKI, T.; TOH-E, A.; FUJII, M.; YAGISAWA, H.; NAKAZAWA, M.; TAKEUCHI, T. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 102, 283–295, 1999.

OKURA, M.; FANG, J.; SALTO, M L ; SINGER, R. S.; DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. A lipid-modified phosphoinositide-specific phospholipase C (TcPI-PLC) is involved in differentiation of trypomastigotes to amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, 280(16), 16235-16243, 2005.

ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M. E. A. A novel *Trypanosoma cruzi* heparin binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration on engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. **Cell**, 67, 411–421, 1991.

PAN, C. *Trypanosoma cruzi*: intracellular stages grown in a cell-free medium at 7 °C. **Exp. Parasitol.**, 45, 215-224, 1978.

PARSONS, M.; NELSON, R. G.; WATKINS, K. P.; AGABIAN, N. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. **Cell**, 38, 309-16, 1984.

PAYS, E. Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. **Trends Parasitol.**, 21(11), 517-520, 2005.

PEREIRA, M. E.; ZHANG, K.; GONG, Y.; HERRERA, E. M.; MING, M. Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. **Infect. Immun.**, 64, 3884–3892, 1996.

PEREIRA, N. M.; TIMM, S. L.; DA COSTA, S. C.; REBELLO, M. A.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of membrane and flagellar fractions. **Exp. Parasitol.**, 46(2), 225-234, 1978.

PROBST, Christian Macagnan. Descrição da metaciclologênese de *Trypanosoma cruzi* pelo uso de microarranjos de DNA. 187 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba-PR, 2005.

RAMIREZ, M. I.; RUIZ, R. C.; ARAYA, J. E.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infect. Immun.**, 61, 3636–3641, 1993.

REED, S. G. TGF- β in infections and infectious diseases. **Microbes Infect.**, 1, 1313–1325, 1999.

ROITMAN, C.; ROITMAN, I.; DE AZEVEDO, H. P. Growth of an insect Trypanosomatid at 37 °C in a defined medium. **J. Protozool.**, 19(2), 346-9, 1972.

RONDINELLI, E.; SILVA, R.; DE OLIVEIRA, F.; DE ALMEIDA, C.; DE CARVALHO, E.; TORRES, F. *Trypanosoma cruzi*: an in vitro cycle of cell differentiation in Axenic culture. **Exp. Parasitol.**, 66, 197-204, 1988.

RUIZ, R. C.; FAVORETO, S.; DORTA, M. L.; OSHIRO, M. E. M.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca^{2+} signaling activity. **Biochem. J.**, 330, 505–511, 1998.

SALTO, M. L.; BERTELLO, L. E.; VIEIRA, M.; DOCAMPO, R.; MORENO, S. N.; DE LEDERKREMER, R. M. Formation and remodeling of inositolphosphoceramide during differentiation of *Trypanosoma cruzi* from trypomastigote to amastigote. **Eukaryot. Cell.**, 2(4), 756-68, 2003.

SANTA-RITA, R. M.; SANTOS BARBOSA, H.; MEIRELLES, M. N.; DE CASTRO, S. L. Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, 75(2), 219-28, 2000.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M. A.; LIMA, A. P. C. A.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MÜLLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. **J. Exp. Med.**, 192, 1289–1299, 2000.

SCHENKMAN, R. P.; VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, 61, 898–902, 1993.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitol. Today**, 9, 218–222, 1993.

SCHENKMAN, S.; YOSHIDA, N.; CARDOSO DE ALMEIDA, M. L. Glycophosphatidylinositol – anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 29, 141–152, 1988.

SCHNEIDER, A.; MARÉCHAL-DROUARD, L. Mitochondrial tRNA import: are there distance mechanisms? **Trends Cell. Biol.**, 10, 509–513, 2000.

SCHÜRCH, N.; HEHL, A.; VASSELLA, E.; BRAUN, R.; RODITI, I. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. **Mol. Cell. Biol.**, 14, 3668–3675, 1994.

SCHUSTER, F. L.; SULLIVAN, J. J. Cultivation of Clinically Significant Hemoflagellates. **Clinical Microbiology Reviews**, 15(3), 374–389, 2002.

SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 324(2), 744-52, 2004.

SMITH, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.** 3, art 3. 2004.

SIMÕES-BARBOSA, A.; BARROS, A. M.; NITZ, N.; ARGANARAZ, E. R.; TEIXEIRA, A. R. L. Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94, 249-252, 1999.

SIMPSON, A. G. B.; GILL, E. E.; CALLAHAN, H. A.; LITAKER, R. W.; ROGER, A. J. Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. **Protist**, 155, 407-422, 2004.

SOKAL, R. R., MICHENER, C.D. Statistical method for evaluating systematic relationships. **Univ. Kans. Sci. Bull.**, 38, 1409-38, 1958.

SOUTO-PADRÓN, T.; HARTH, G.; SOUZA, W. Immunocytochemical localization of neuraminidase in *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, 58, 586–592, 1990.

STURM, N. R.; YU, M. C.; CAMPBELL, D. A. Transcription termination and 3'-end processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. **Mol. Cell. Biol.**, 19, 1595–1604, 1999.

SUTTON, R. E.; BOOTHROYD, J. C. Evidence for trans splicing in trypanosomes. **Cell**, 14, 527-35, 1986.

TEIXEIRA, A. R. L.; LACAVA, Z.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. Insertion of *Trypanosoma cruzi* DNA in the genome of mammal host cell through infection. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 24, 55-58, 1991.

THOMPSON, C.; DVORAK, J. A. Quantitation of total DNA per cell in an exponentially growing population using the diphenylamine reaction and flow cytometry. **Analytical Biochem.**, 177, 353-357, 1989.

TIMM, S. L.; PEREIRA-NETTO, A. D.; OLIVEIRA M. M. Fatty acids of *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol B.**, 71(3), 397-402, 1982.

TOMLINSON, S.; VANDEKERCKHOVE, F.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, 110, 547-554, 1995.

TSCHUDI, C.; ULLUT, E. Unconventional rules of small nuclear RNA transcription and cap modification in trypanosomatids, **Gene Expression**, 10, 3–16, 2002.

TUSHER, V. G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 98, 5116-5121, 2001.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, 31, 472-481, 2001.

ULLU, E.; MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C. Temporal order of RNA processing reactions in trypanosomes: rapid *trans*-splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. **Mol. Cell. Biol.**, 13, 720–725, 1993.

VAN DER PLOEG, L. H.; SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R.; BORST, P. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. **Cell**, 37(1), 77-84, 1984a.

VAN DER PLOEG, L. H.; LIU, A. Y.; BORST, P. Structure of the growing telomeres of Trypanosomes. **Cell**, 36(2), 459-68, 1984b.

VAN DER PLOEG, L. H.; CORNELISSEN, A. W.; BARRY, J. D.; BORST, P. Chromosomes of kinetoplastida. **EMBO J.**, 3(13), 3109-15, 1984c.

VANHAMME, L.; PAYS, A.; TEBABI, P.; ALEXANDRE, S.; PAYS, E. Specific binding of proteins to the noncoding strand of a crucial element of the variant surface glycoprotein, procyclin, and ribosomal promoters of *Trypanosoma brucei*, **Mol. Cell. Biol.**, 15, 5598–5606, 1995.

VASSELLA, E.; BRAUN, R.; RODITI, I. Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? **Nucleic Acids Res.**, 22, 1359–1364, 1994.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Growth of isolated amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cell-free medium. **J. Protozool.**, 29, 570–576, 1982.

WAGNER, W.; SO, M. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. **Infect. Immun.**, 58, 3217-3224, 1990.

WAINSZELBAUM, M. J.; BELAUNZARAN, M. L.; LAMMEL, E. M.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; ISOLA, E. L. Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, 375(Pt 3), 705-12, 2003.

WALDER, J. A.; EDER, P. S.; ENGMAN, D. M.; BRENTANO, S. T.; WALDER, R. Y.; KNUTZON, D. S.; DORFMAN, D. M.; DONELSON, J. E. The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. **Science**, 233, 569-571, 1986.

WANDERLEY, J. L.; MOREIRA, M. E.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. **J. Immunol.**, 176, 1834–1839, 2006.

WASSEF, M. K.; FIORETTI, T. B.; DWYER, D. M. Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes. **Lipids**, 20(2), 108-15, 1985.

WESTENBERGER, S. J.; BARNABE, C.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, 171(2), 527-543, 2005.

WESTENBERGER, S. J.; CERQUEIRA, G. C.; EL-SAYED, N. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and possess a conserved element in the non-coding region. **B.M.C. Genomics**, 7, 60, 2006.

WILLIAMS, R. O.; YOUNG, J. R.; MAJIWA, P. A. Genomic environment of *T. brucei* VSG genes: presence of a minichromosome. **Nature**, 299(5882), 417-21, 1982.

WILLIS, I. M. RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity, **Eur. J. Biochem.**, 212, 1–11, 1993.

YOSHIDA, N.; BLANCO, S. A.; ARAGUTH, M. F.; RUSSO, M.; GONZALEZ, J. The stage-specific 90- kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 39, 39–46, 1990.

YOSHIDA, N.; DORTA, M. L.; FERREIRA, A. T.; OSHIRO, M. E. M.; MORTARA, R. A.; ACOSTA-SERRANO, A.; FAVORETO-JR, S. Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 84, 57–67, 1997.

YOSHIDA, N.; FAVORETO-JR, S.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33, 269–278, 2000.

ZELEDON, R. Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*. In "Atlas of Chaga's Disease Vectors in the Americas". **Editora Fiocruz.**, 1, 271-287, 1997.

ZELEDON, R. Differentiation of *Trypanosoma rangeli* and *Schizotrypanum cruzi* in a liquid medium, with notes on the nutrition of flagellates. **J. Parasitol.**, 45, 652, 1959.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Inter. J. Parasitol.**, 28, 105-112, 1998.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; ALMEIDA, K.; UMEZAWA, E. S.; SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; CANO, M. I.; DA SILVEIRA, J. F.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; BRENER, A.; MACEDO, A. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta Trop.**, 68(2), 159-173, 1997.

ANEXOS

ANEXO I

Nome e estrutura dos principais lipídios obtidos em modo negativo. Os dados de nome sistemático, abreviatura e estrutura se aplicam ao íon de menor m/z , quando houver mais de um. Como a diferença estrutural nestes casos é bem pequena (menos uma ou duas ligações duplas) eles foram agrupados por questão de conveniência.

m/z : 279/281/283

Nome Sistemático: 9Z,12Z-octadecadienoic acid

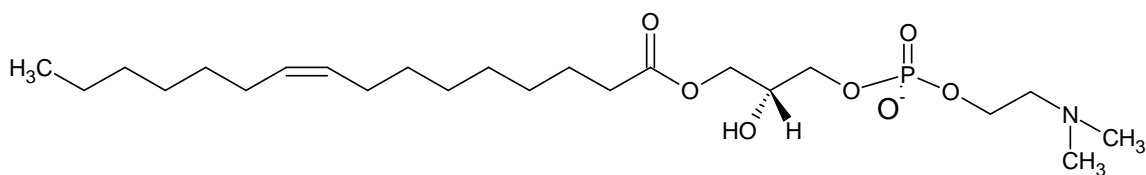
Abreviatura: C(18:2(9Z,12Z))



m/z : 476/478

Nome Sistemático: 1-(9Z-hexadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine

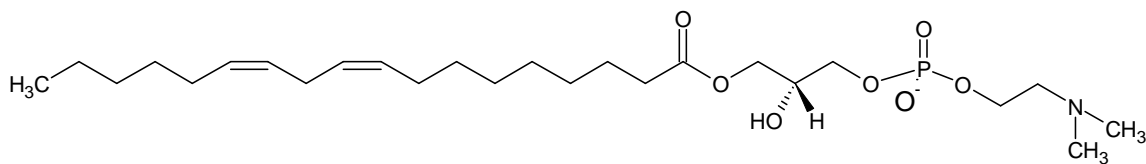
Abreviatura: GPCho(16:1(9Z)/0:0)



m/z : 504

Nome Sistemático: 1-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine

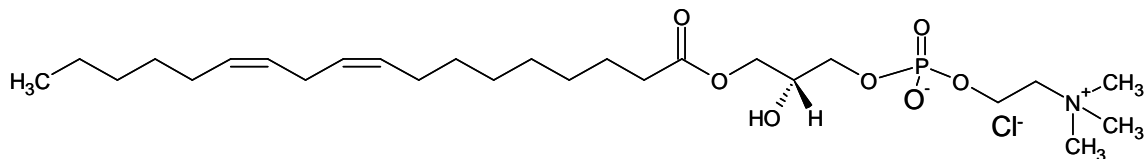
Abreviatura: GPCho(18:2(9Z,12Z)/0:0)



m/z: 554/556

Nome Sistemático: 1-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine

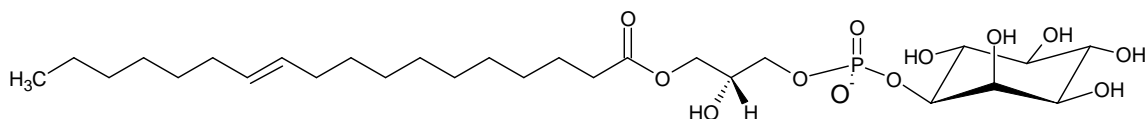
Abreviatura: GPCho(18:2(9Z,12Z)/0:0)



m/z: 595/597

Nome Sistemático: 1-(11E-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)

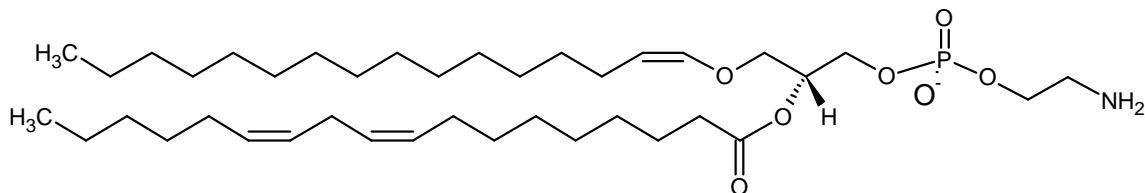
Abreviatura: GPIIns(18:1(11E)/0:0)



m/z: 698/700

Nome Sistemático: 1-(1Z-hexadecenyl)-2-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

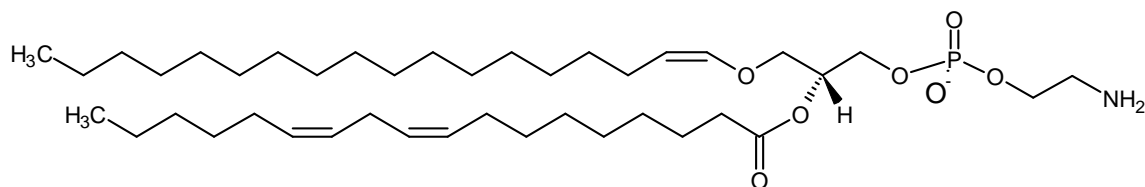
Abreviatura: GPEtn(16:0p/18:2(9Z,12Z))



m/z: 726/728

Nome Sistemático: 1-(1Z-octadecenyl)-2-(11E-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

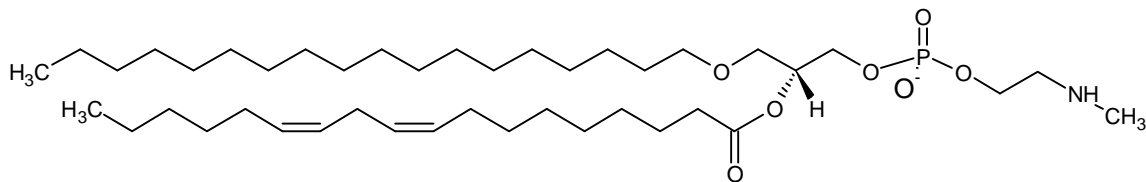
Abreviatura: GPEtn(18:0p/18:2(9Z,12Z))



m/z: 743

Nome Sistemático: 1-octadecyl-2-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-methyl

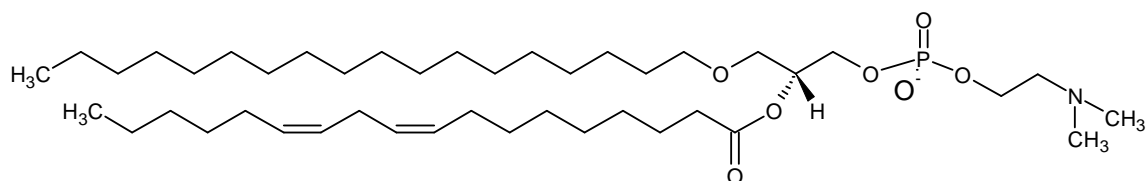
Abreviatura: GPEtnMe(18:0e/18:2(9Z,12Z))



m/z: 756/758

Nome Sistemático: 1-octadecyl-2-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine

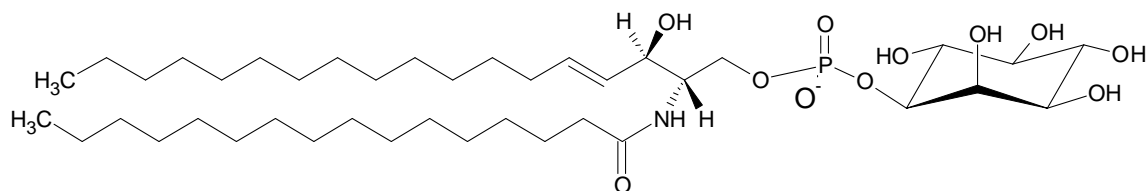
Abreviatura: GPCho(18:0e/18:2(9Z,12Z))



m/z: 778/780

Nome Sistemático: N-(hexadecanoyl)-sphing-4-enine-1-phospho-(1'-myo-inositol)

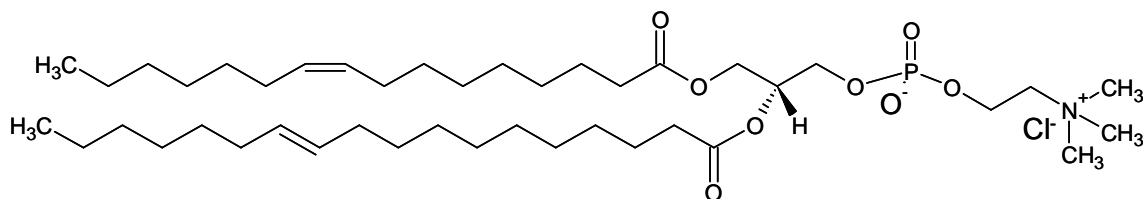
Abreviatura: InsPCer(d18:1/16:0)



m/z: 792

Nome Sistemático: 1-(9Z-hexadecenoyl)-2-(11E-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine

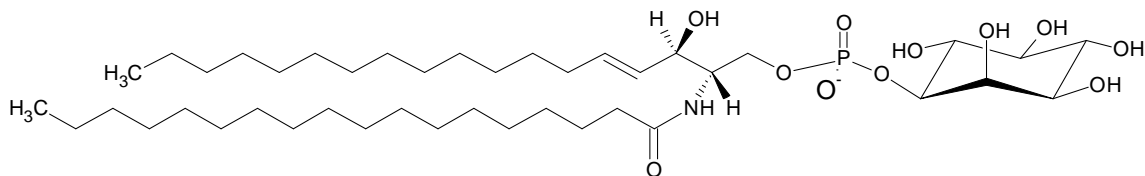
Abreviatura: GPCho(16:1(9Z)/18:1(11E))



m/z: 806/808

Nome Sistemático: N-(octadecanoyl)-sphing-4-enine-1-phospho-(1'-myo-inositol)

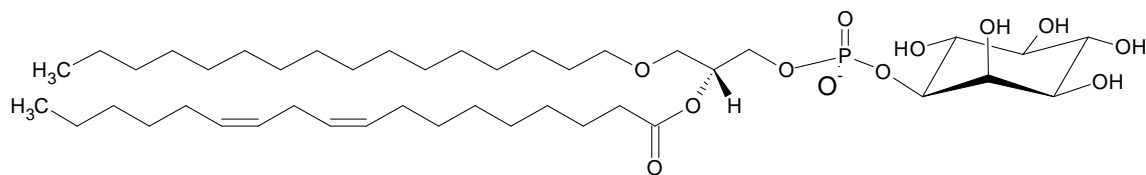
Abreviatura: InsPCer(d18:1/18:0)



m/z: 819/821

Nome Sistemático: 1-hexadecyl-2-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)

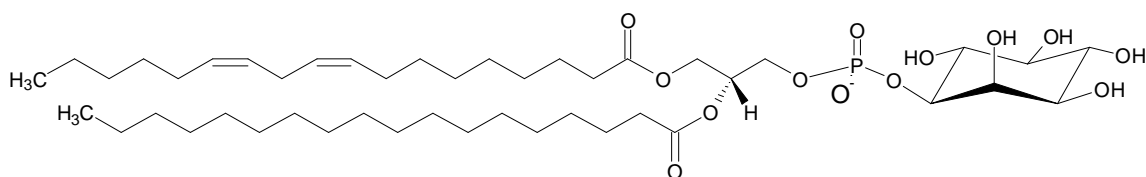
Abreviatura: GPIIns(16:0e/18:2(9Z,12Z))



m/z: 861/863

Nome Sistemático: 1-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-2-octadecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)

Abreviatura: GPIIns(18:2(9Z,12Z)/18:0)



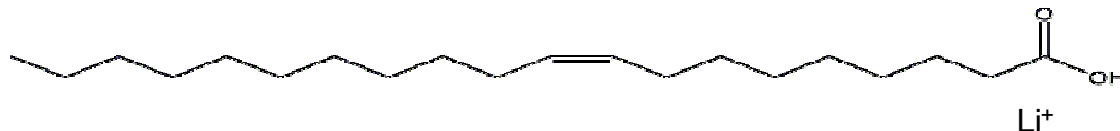
ANEXO II

Nome e estrutura dos principais lipídios obtidos em modo positivo.

m/z 317

Nome Sistemático: 9Z-eicosenoic acid

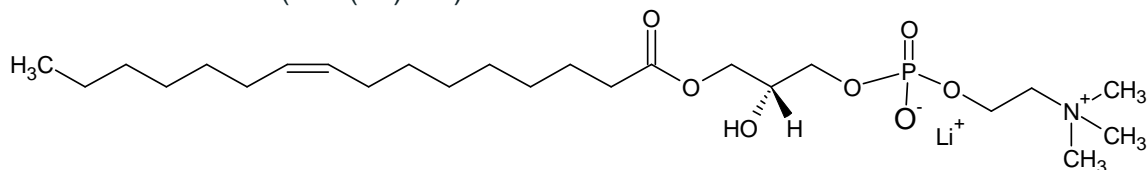
Abreviatura: C(20:1(9Z))



m/z 500

Nome Sistemático: 1-(9Z-hexadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine

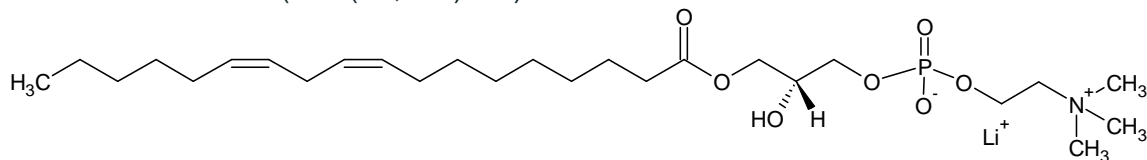
Abreviatura: GPCho(16:1(9Z)/0:0)



m/z 526

Nome Sistemático: 1-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine

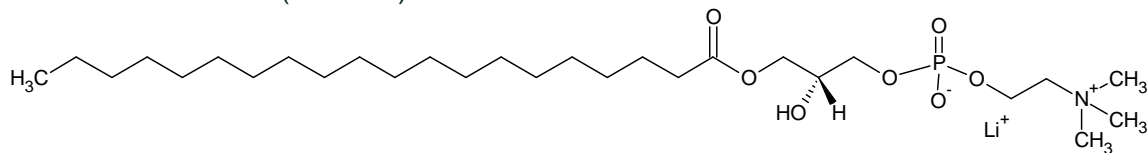
Abreviatura: GPCho(18:2(9Z,12Z)/0:0)



m/z 558

Nome Sistemático: 1-eicosanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

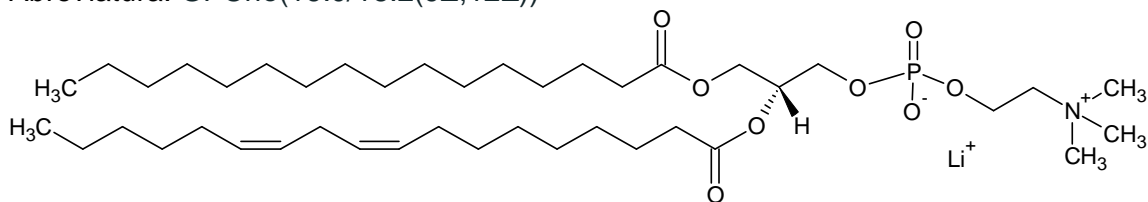
Abreviatura: GPCho(20:0/0:0)



m/z: 764

Nome Sistemático: 1-hexadecanoyl-2-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine

Abreviatura: GPCho(16:0/18:2(9Z,12Z))



m/z: 788

Nome Sistemático: 1,2-di-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine

Abreviatura: GPCho(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z))

